

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 505**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2015** **PCT/US2015/045481**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016** **WO16028672**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2015** **E 15753877 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021** **EP 3182999**

54 Título: **Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3**

30 Prioridad:

19.08.2014 US 201462039081 P
05.06.2015 US 201562171319 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2021

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US

72 Inventor/es:

LIANG, LINDA;
FAYADAT-DILMAN, LAURENCE;
MALEFYT, RENE DE WAAL y
RAGHUNATHAN, GOPALAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 857 505 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 y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-LAG3, así como al uso de los anticuerpos de la presente invención en el tratamiento de enfermedades tales como cáncer e infecciones.

10 **Antecedentes de la invención**

LAG3 (CD223) es una molécula de superficie celular expresada en linfocitos T activados (Huard *et al.* Immunogenetics 39:213-217, 1994), células NK (Triebel *et al.* J Exp Med 171:1393-1405, 1990), linfocitos B (Kisielow *et al.* Eur J Immunol 35:2081-2088, 2005) y células dendríticas plasmocitoides (Workman *et al.* J Immunol 182:1885-1891, 2009) que desempeña un papel importante en la función de estos subconjuntos de linfocitos. Además, la interacción entre LAG3 y su ligando principal, MHC de clase II, se cree que desempeña un papel en la modulación de la función de las células dendríticas (Andreae *et al.* J Immunol 168:3874 - 3880, 2002). Estudios preclínicos recientes han documentado un papel de LAG-3 en el agotamiento de los linfocitos T CD8 (Blackburn *et al.* Nat Immunol 10:29 - 37, 2009).

Al igual que con la infección vírica crónica, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de antígenos tumorales muestran una función efectora deteriorada y un fenotipo agotado caracterizado por una producción disminuida de citocinas proinflamatorias e hiposensibilidad a la nueva estimulación antigénica. Esto está mediado por mecanismos celulares extrínsecos, tal como los linfocitos T reguladores (Treg) y los mecanismos celulares intrínsecos, tal como moléculas inhibitoras que se regulan positivamente en los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) agotados. Estos mecanismos

inhibidores representan una barrera formidable para la inmunidad antitumoral eficaz. LAG se expresa en TIL tolerizados, lo que sugiere que contribuyen a la supresión inmunitaria mediada por tumores. La inhibición de LAG3 puede conducir a una activación potenciada de los linfocitos T específicos de antígeno de los que se puede obtener un beneficio terapéutico. Existe una necesidad en la técnica de anticuerpos terapéuticos de alta eficacia que antagonicen la actividad de LAG3 que puedan usarse para generar una respuesta inmunitaria fuerte a los tumores.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, un anticuerpo multispecifico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado antagonista, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo de dominio único camelizado) que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116.

En algunas realizaciones, el anticuerpo consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulina y dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126, y cada cadena pesada de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116 y una región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana comprende una mutación S228P de acuerdo con el sistema UE.

En algunas realizaciones, el anticuerpo consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulina y dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y cada cadena pesada de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116.

En algunas realizaciones, el anticuerpo consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulina y dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y cada cadena pesada de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116.

En algunas realizaciones, el anticuerpo consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulina y dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos

expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y cada cadena pesada de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se expresa a partir de una célula de ovario de hámster chino.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está glicosilado con uno o más de los N-glicanos unidos a CHO que son G0-F, G1-F, G2-F, G0, G1, G2 o Man5.

10 La presente invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende además un anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab.

15 La presente invención también proporciona un dispositivo de inyección que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o la composición de la invención.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica: el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada o la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada de inmunoglobulina de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención.

20 La presente invención también proporciona un vector que comprende el polinucleótido de la invención.

La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, el polinucleótido o el vector de la invención.

25 La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que comprende:

- 30 a. cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo, o un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada del fragmento de unión a antígeno en un medio de cultivo en condiciones favorables para la expresión del polinucleótido; y
- 35 b. opcionalmente, recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la célula hospedadora y/o del medio de cultivo.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino.

40 La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 humana que es el producto del método anterior.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o composición de la invención, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

45 La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o composición de la invención, para su uso en el tratamiento de cáncer.

También se divulga en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 (p. ej., humana y/o de *Macaqa fascicularis*, p. ej., SEQ ID NO: 443 o 445) que comprende: una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene al menos un 78,99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 106; y/o una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene al menos un 78,38 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1-111 del SEQ ID NO: 224.

55 un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina (p. ej., dominios variables de cadena pesada y ligera o CDR de cadena pesada y ligera) de Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9 como se establece en el presente documento.

60 También se divulga en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 (p. ej., LAG3 humana o de mono cynomolgus) que comprende (a) la CDR1, CDR2 y CDR3 de un dominio V_L de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 59, 61, 63, 65, 101, 126, 130, 132, 136, 138, 208, 210, 224, 226, 228, 230, 232, 241, 257, 259, 261, 263, 351, 369, 371, 373, 375, 401, 403, 405, 426, 427, 450-453 o 459-461; y/o (b) la CDR1, CDR2 y CDR3 de un dominio V_H de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 128, 134, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158,

160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 234, 235, 237, 239, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 406-419, 434-442, 448, 449, 462, 463 o 464.

También se divulga en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 (p. ej., humana o de mono cynomolgus) que comprende (1) un dominio variable de cadena ligera que comprende la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 458); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (2) un dominio variable de cadena ligera que comprende la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 456); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (3) un dominio variable de cadena ligera que comprende: la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 457); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (4) un dominio variable de cadena ligera que comprende la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 455); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (5) un dominio variable de cadena ligera que comprende la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 454); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35).

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 (p. ej., LAG3 humana o de mono cynomolgus) puede comprender las CDR de diversas regiones variables de cadena ligera y/o pesada y puede tener al menos un 90 % de identidad general de secuencia de aminoácidos con la región variable, es decir, la variabilidad en la cadena se produce fuera de las CDR, p. ej., (1) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 106 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 106 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (2) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 108 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 108 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (3) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 110 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 110 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (4) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos

expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 112 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 112 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (5) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 114 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 114 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (6) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 116 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (7) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 118 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 118 o los aminoácidos 1-119 de la misma; (8) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 120 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 120 o los aminoácidos 1-119 de la misma; y/o (9) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 126 o los aminoácidos 21-131 de la misma, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 122 o los aminoácidos 1-119 de la misma, y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 122 o los aminoácidos 1-119 de la misma. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender las diversas regiones variables de cadena ligera madura y/o pesada madura de inmunoglobulina y puede tener al menos un 90 % de identidad general de secuencia de aminoácidos con la región variable de inmunoglobulina sin procesar (incluida la secuencia señal), es decir, la variabilidad se produce fuera de las secuencias de cadena de inmunoglobulina maduras.

También se divulga en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 (p. ej., LAG3 humana o de mono cynomolgus) que comprende un dominio V_L o cadena ligera de inmunoglobulina maduros o sin procesar de SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 59, 61, 63, 65, 101, 126, 130, 132, 136, 138, 208, 210, 224, 226, 228, 230, 232, 241, 257, 259, 261, 263, 351, 369, 371, 373, 375, 401, 403, 405, 426, 427, 451-453 o 459-461; y/o un dominio V_H o cadena pesada de inmunoglobulina maduros o sin procesar de SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 128, 134, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 234, 235, 237, 239, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 406-419, 434-442, 448, 449, 462, 463 o 464. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender: (1) un dominio variable de cadena ligera que comprende: la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 458); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (2) un dominio variable de cadena ligera que comprende: la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de

- aminoácidos: DINPNSGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 456); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (3) un dominio variable de cadena ligera que comprende: la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNDGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 457); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (4) un dominio variable de cadena ligera que comprende: la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNQGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 455); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35); o (5) un dominio variable de cadena ligera que comprende: la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38); la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos: GASNLES (SEQ ID NO: 39); y la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40); y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende: la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos: DYNVD (SEQ ID NO: 33); la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos: DINPNGGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 454); y la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35). En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento se glicosila con N-glicanos unidos a levaduras modificadas por ingeniería o N-glicanos unidos a CHO. Opcionalmente, cualquiera de los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se caracterizan por una o más de las siguientes propiedades: inhibe la unión de LAG3 a moléculas MHC de clase II; compite con las moléculas MHC de clase II por la unión a LAG3; se une al bucle adicional de LAG3; se une a LAG3 con una K_D de aproximadamente 10^{-9} M hasta aproximadamente 2×10^{-12} M; se une a LAG3 natural en la superficie de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ activados; se une a LAG3 humana y/o de mono cynomolgus; inhibe la homodimerización de LAG3; estimula la producción de IL-2 por linfocitos T específicos de antígeno; marca el tejido de las amígdalas; no marca el tejido de cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas y/o hipofisiario; se une a LAG3 humana poniendo en contacto los restos QEGAPQL (aminoácidos 35-42 del SEQ ID NO: 443) y RPARRADAGEYRAAVH (aminoácidos 137-152 del SEQ ID NO: 443) y, opcionalmente, los restos DERGRQRGDFSLW (aminoácidos 123-135 del SEQ ID NO: 443) de LAG3; o los restos SPTIPLQDL (aminoácidos 45-53 del SEQ ID NO: 443) y, opcionalmente DERGRQRGDFSL (aminoácidos 123-134 del SEQ ID NO: 443) de LAG3; o los restos HPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVL (aminoácidos 78-102 del SEQ ID NO: 443) de LAG3; y/o protegiendo los hidrógenos de la cadena principal de amida de dichos restos del intercambio con un deuterio. La presente invención también proporciona cualquier anticuerpo o fragmento de este tipo en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento anti-LAG3 se inmoviliza en un sustrato sólido. El anticuerpo anti-LAG3 o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9 (como se establece en el presente documento).
- También se divulga en el presente documento un complejo que comprende un anticuerpo o un fragmento anti-LAG3 analizados en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) en forma de complejo con LAG3 (p. ej., humana o de mono cynomolgus) o con un fragmento del mismo o con un anticuerpo secundario (p. ej., anticuerpo secundario marcado de forma detectable) que se une específicamente al anticuerpo o fragmento anti-LAG3. En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento está *in vitro* (p. ej., está inmovilizado en un sustrato sólido) o está en el cuerpo de un sujeto. En una realización de la invención, LAG3 está *in vitro* (p. ej., está inmovilizada en un sustrato sólido) o está en la superficie de una célula o está en el cuerpo de un sujeto.
- La presente invención proporciona además una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención que están aislados, anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, p. ej., que están humanizados, p. ej., anticuerpos antagonistas humanizados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
- La presente invención también proporciona una composición que comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención en asociación con un agente terapéutico adicional (p. ej., un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula orgánica pequeña) tal como un inhibidor de un receptor inmunomodulador, un antiemético, un inhibidor de MTOR (diana de rapamicina en mamíferos), un agente citotóxico, un agente de platino, un inhibidor de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), un inhibidor de VEGF (factor de crecimiento epidérmico vascular), un estabilizador de microtúbulos, un taxano, un inhibidor de CD20, un inhibidor de CD52, un inhibidor de CD30, un inhibidor de RANK (receptor activador del factor kappa-B nuclear), un inhibidor de RANKL (receptor activador del ligando del factor kappa-B nuclear), un inhibidor de ERK, un inhibidor de MAP cinasa, un inhibidor de AKT, un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K, un inhibidor de HER1, un inhibidor de HER2, un inhibidor de HER3, un inhibidor de HER4, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de CD22, un inhibidor de CD79b, un inhibidor de ErbB2 y/o un inhibidor de la proteína farnesil transferasa. En una realización de la invención, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, pembrolizumab, nivolumab, CT-011, un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-TIM3

o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-CS1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, elotuzumab, anticuerpo anti-KIR2DL1/2/3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, lirilumab, un anticuerpo anti-CD137 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, urelumab, un anticuerpo anti-GITR o un fragmento de unión a antígeno del mismo, TRX518, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, BMS-936559, MSB0010718C, MPDL3280A, un anticuerpo anti-PD-L2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT6 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-ILT8 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-OX40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-CD137 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR2DL1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR2DL2/3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR2DL4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR2DL5A o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR2DL5B o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR3DL1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR3DL2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-KIR3DL3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-NKG2A o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-NKG2C o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o un anticuerpo anti-NKG2E o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o cualquier molécula orgánica pequeña inhibidora de dichas dianas; IL-10, anti-IL10, anti-TSLP y/o IL-10 PEGilada. En una realización de la invención, el agente terapéutico adicional es el ácido 13-cis-retinoico, 3-[5-(metilsulfonilpiperadinmetil)-indolil]-quinolona, 4-hidroxitamoxifeno, 5-desoxiuridina, 5'-desoxi-5-fluorouridina, 5-fluorouracilo, 6-mecaptopurina, 7-hidroxistauropurina, A-443654, acetato de abiraterona, abraxano, ABT-578, acolbifeno, ADS-100380, aflibercept, ALT-110, altretamina, amifostina, aminoglutetimida, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, angiostatina, AP-23573, ARQ-197, arzoxifeno, AS-252424, AS-605240, asparaginasa, AT-9263, ATI3387, atrasentán, axitinib, AZD1152, vacuna de *Bacilo de Calmette-Guerin* (BCG), batabulina, BC-210, BGJ398, besodutox, bevacizumab, bicalutamida, Bio111, BIO140, BKM120, bleomicina, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, bortezomib, buserelina, busulfán, calcitriol, camptotecina, canertinib, capecitabina, carboplatino, carmustina, CC8490, cediranib, CG-1521, CG-781, clamidocina, clorambucilo, clorotoxina, cilengitida, cimitidina, cisplatino, cladribina, clodronato, cobimetnib, COL-3, CP-724714, ciclofosfamida, ciproterona, acetato de ciproterona, citarabina, arabinósido de citosina, dabrafenib, dacarbazina, dacinostat, dactinomicina, dalotuzumab, danusertib, dasatanib, daunorrubicina, decatanib, deguelin, denileucina, desoxicoformicina, depsipéptido, diarilpropionitrilo, dietilestilbestrol, diftotox, DNE03, docetaxel, dovitinib, doxorubicina, droloxifeno, edotecarina, edotreótido marcado con itrio-90, edotreotida, EKB-569, EMD121974, encorafenib, endostatina, enzalutamida, enzastaurina, epirubicina, epitilona B, ERA-923, erbitux, erlotinib, estradiol, estramustina, etopósido, everolimus, exemestano, ficlatuzumab, finasterida, flavopiridol, fluriduridina, fludarabina, fludrocortisona, fluoximasterona, flutamida, régimen FOLFOX, fulvestrant, galeterona, ganetespib, gefitinib, gemcitabina, gimatecán, goserelina, acetato de goserelina, gosipol, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, caproato de hidroxiprogesterona, hidroxiiurea, IC87114, idarrubicina, idoxifeno, ifosfamida, IM862, imatinib, IMC-1C11, INCB24360, INC280, INO1001, interferón, interleucina-12, ipilimumab, irinotecán, JNJ-16241199, ketoconazol, KRX-0402, lapatinib, lasofoxifeno, LEE011, letrozol, leucovorina, leuprolida, acetato de leuprolida, levamisol, paclitaxel atrapado en liposomas, lomustina, lonafarnib, lucantona, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY3009120, LY317615, marimastat, mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, MEK162, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, tozasertib, MLN8054, natitoclax, neovastat, neratinib, neuradiab, nilotinib, nilutimida, nolatrexed, NVP-BE2235, oblimersen, octreotida, ofatumumab, oregovomab, ornatuzumab, orteronel, oxaliplatino, paclitaxel, palbociclib, pamidronato, panitumumab, pazopanib, PD0325901, PD184352, PEG-interferón, pemetrexed, pentostatina, perifosina, mostaza de fenilalanina, PI-103, pictilisib, PIK-75, pipendoxifeno, PKI-166, plicamicina, PLX8394, porfímero, prednisona, procarbazona, progestinas, PX-866, R-763, raloxifeno, raltitrexed, razoxina, ridaforolimus, rituximab, romidepsina, RTA744, rubitecán, scriptaid, Sdx102, seliciclib, selumetinib, semaxanib, SF1126, sirolimus, SN36093, sorafenib, espirolactona, escualamina, SR13668, estreptozocina, SU6668, ácido hidroxámico suberoilánilida, sunitinib, estrógeno sintético, talampanel, talimogén laherparepvec, tamoxifeno, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, tesmilifeno, testosterona, tetrandrina, TGX-221, talidomida, 6-tioguanina, tiotepa, ticilimumab, tipifarnib, tivozanib, TKI-258, TLK286, topotecán, citrato de toremifeno, trabectedina, trametinib, trastuzumab, tretinoína, tricotatrina A, triciribinfosfato monohidrato, pamoato de triptorelina, TSE-424, mostaza de uracilo, ácido valproico, valrubicina, vandetanib, vatalanib, trampa de VEGF, vemurafenib, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vitaxina, vitespán, vorinostat, VX-745, wortmanina, Xr311, zanolimumab, ZK186619, ZK-304709, ZM336372, ZSTK474, casopitant, netupitant, palonosetrón, aprepitant, difenhidramina, hidroxizina, metoclopramida, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexametasona, metilprednisolona, proclorperazina, granisetron, ondansetrón, dolasetron, tropisetron, GCSF, PEG-GCSF, eritropoyetina, epoetina alfa y darbepoetina alfa. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo está en asociación con pembrolizumab. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo está en asociación con novolumab. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo está en asociación con CT-011. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo está en asociación con BMS-936559.

También se divulga en el presente documento un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 426, 427, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 446, 448, 449, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463 y 464 por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17, 22, 27, 32 y 37; o un fragmento maduro de la misma. También se divulga en el presente documento un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos, p. ej., la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402 y 404; o un fragmento maduro de la misma. También se incluye en la presente invención un vector (p. ej., un plásmido) que comprende el polinucleótido. Una célula hospedadora (p. ej., de mamífero, bacteriana, de ovario de hámster chino (CHO), eucariota inferior, fúngica, de levadura, *Pichia*, *Pichia pastoris*) también es parte de la presente invención en donde la célula hospedadora comprende un anticuerpo, fragmento, polipéptido, polinucleótido y/o vector establecidos en el presente documento.

La presente invención también proporciona vacunas que comprenden un anticuerpo o fragmento expuesto en el presente documento, un antígeno (p. ej., antígeno peptídico vírico, partícula de tipo vírico, antígeno peptídico tumoral) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un recipiente (p. ej., un vial de plástico o vidrio) o un dispositivo de inyección (p. ej., una jeringa tal como una jeringa precargada o un autoinyector) que comprende cualquier anticuerpo, fragmento, polipéptido, polinucleótido, vector, composición o vacuna analizados en el presente documento.

La presente invención también proporciona un método para tratar un cáncer (p. ej., osteosarcoma, rabdomiosarcoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de células transicionales renales, cáncer de vejiga, cáncer de Wilm, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer óseo, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, sarcoma sinovial, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, mieloma múltiple, cáncer de células renales, retinoblastoma, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, melanoma, tumor rabdoide de riñón, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, cáncer de cerebro, glioblastoma, meningioma, adenoma hipofisario, schwannoma vestibular, un tumor neuroectodérmico primitivo, meduloblastoma, astrocitoma, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma, ependimoma, papiloma del plexo coroideo, policitemia vera, trombocitemia, mielofibrosis idiopática, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, cáncer carcinoide o cáncer de hígado, cáncer de mama o cáncer de estómago) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 o una vacuna analizada en el presente documento opcionalmente, en asociación con un agente terapéutico o un procedimiento terapéutico adicional (p. ej., tumorectomía quirúrgica o radioterapia contra el cáncer).

La presente invención también proporciona un método de administración de un anticuerpo, fragmento, composición, polipéptido, vacuna o polinucleótido anti-LAG3 analizado en el presente documento, o una composición farmacéutica de los mismos, a un sujeto que comprende inyectar el anticuerpo, fragmento, polipéptido, vacuna o polinucleótido en el cuerpo del sujeto usando un dispositivo de inyección; y, opcionalmente, también administrar un agente terapéutico adicional al sujeto.

La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo o polipéptido analizado en el presente documento que comprende: a. cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento en un medio de cultivo en condiciones favorables para la expresión del polinucleótido; y b. opcionalmente, recuperar el anticuerpo, fragmento o polipéptido de la célula hospedadora y/o medio de cultivo. En una realización de la invención, el método comprende la etapa de introducir el polinucleótido en la célula hospedadora, p. ej., por transformación o transfección.

La presente invención también proporciona un método para detectar la presencia de un péptido de LAG3 o un fragmento del mismo en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento

anti-LAG3 analizado en el presente documento y detectar la presencia de un complejo entre el anticuerpo o fragmento y el péptido; en donde la detección del complejo indica la presencia del péptido de LAG3.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Unión de clones anti-LAG3 humana a células CHO-K1 que expresan LAG3 humana y de mono cynomolgus.

Figura 2. Unión de clones de LAG3 a linfocitos T primarios humanos y de mono cynomolgus.

Figura 3. Estructura tridimensional de LAG3 humana. Se indica la ubicación de los epítomos de los anticuerpos 22D2, 11C9 y 4A10.

Figura 4 (a-c). Mapa de calor que indica regiones en LAG3 humana que están protegidas de manera fuerte o débil de la deuteración por la unión a anticuerpos. (a) mapa de calor de diferencia de LAG3 humana/22D2; (b) mapa de calor de diferencia de LAG3 humana/11C9; (c) mapa de calor de diferencia de LAG3 humana/4A10.

Figura 5 (a-b). Mapas de calor combinados que indican (a) regiones en LAG3 humana que están protegidas de la deuteración por la unión de 22D2, 11C9 y 4A10 y (b) la ubicación en LAG3 humana que media la unión a MHC2.

Figura 6. N-glicanos unidos predominantes para los anticuerpos monoclonales producidos en células de ovario de hámster chino (N-glicanos unidos a CHO) y en células de levadura modificadas por ingeniería (N-glicanos unidos a levadura modificada por ingeniería): cuadrados: N-acetilglucosamina (GlcNAc); círculos: manosa (Man); diamantes: galactosa (Gal); triángulos: fucosa (Fuc).

Figura 7. Efecto del tratamiento con anticuerpo anti-LAG-3 humana +/- tratamiento anti-PD-1 sobre la producción de IL-2 en PBMC humanas estimuladas con SEB. Las PBMC se activaron mediante SEB durante 3 días y la concentración de IL-2 en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante MSD. Donante 089: SEB 30 ng/ml. Se usó anti-PDI a 10 µg/ml.

Figura 8. Efecto del tratamiento con hu22D2 +/- tratamiento anti-PD-1 sobre la producción de IFN-γ y TNFα en PBMC humanas estimuladas con MLR. Las PBMC se activaron con CD derivadas de monocitos alogénicas durante 7 días y la concentración de IFN-γ y TNF-α en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante MSD. Se usó anti-PD-1 a 3 µg/ml. El isotipo se utilizó a 200 nM.

Figura 9. Análisis de ensayo de captura de antígeno de la concentración de anticuerpo anti-LAG3 no unido y parcialmente unido Ab6 en sujetos de monos cynomolgus a lo largo del tiempo a varias dosis (0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg; 1 mg/kg; 10 mg/kg; 30 mg/kg).

Figura 10. Análisis de ensayo universal de la concentración de anticuerpo anti-LAG3 total Ab6 en sujetos de monos cynomolgus a lo largo del tiempo a diversas dosis (0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg; 1 mg/kg; 10 mg/kg; 30 mg/kg).

Figura 11. Los datos de concentración normalizada por dosis de Ab6 a lo largo del tiempo en sujetos de monos cynomolgus a diversas dosis (0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg; 1 mg/kg; 10 mg/kg; 30 mg/kg).

Figura 12. Evaluación del aclaramiento relacionado con la diana (V_{máx}, K_m) de varias dosis de anticuerpo anti-LAG3 Ab6 a diversas dosis.

Descripción detallada

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen una afinidad excepcionalmente alta por LAG3 humana y LAG3 de mono cynomolgus, así como los usos de los mismos y los métodos para producir los mismos como se analiza en el presente documento. Por ejemplo, la afinidad (K_D) para LAG3 humana mediante el ensayo KinExA se midió que era tan alta como 2 pM y la afinidad por LAG3 de cynomolgus está en el intervalo pM de dos dígitos bajos. Un punto isoeléctrico particularmente bajo (p. ej., aproximadamente 6,3) hace que algunos de estos anticuerpos sean exclusivos. Asimismo, aunque algunos anticuerpos se unen a LAG3 principalmente fuera de la región del bucle adicional, muestran la capacidad de bloquear la unión de LAG3/MCH de clase II. Asimismo, los anticuerpos anti-LAG3 de la presente invención tienen un alto grado de especificidad para unirse a LAG3 sobre otras proteínas relacionadas. Dichos anticuerpos y fragmentos expuestos en el presente documento pueden ser útiles, por ejemplo, para el tratamiento de diversos cánceres y enfermedades infecciosas.

Abreviaturas

A lo largo de la descripción detallada y de los ejemplos de la invención, se utilizarán las siguientes abreviaturas:

ADCC citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (por sus siglas en inglés)
 CDC citotoxicidad dependiente del complemento (por sus siglas en inglés)
 CDR región determinante de complementariedad (por sus siglas en inglés) en las regiones variables de inmunoglobulina, definidas mediante el sistema de numeración de Kabat
 CHO ovario de hámster chino (por sus siglas en inglés)
 concentración CE50 que da como resultado una eficacia o unión del 50 %
 ELISA ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)
 FR región marco (por sus siglas en inglés) de un anticuerpo: las regiones variables de inmunoglobulina excluyendo las regiones CDR.
 HRP peroxidasa de rábano picante (por sus siglas en inglés)
 concentración CI50 que da como resultado una inhibición del 50 %
 IgG Inmunoglobulina G

Kabat, un sistema de alineación y numeración de inmunoglobulinas liderado por Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

mAb o Mab o MAB, anticuerpo monoclonal

PCR reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

5 región V El segmento de cadenas de IgG cuya secuencia es variable entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el resto 109 de Kabat en la cadena ligera y hasta el 113 en la cadena pesada.

VH Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina

VK región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina

10 Definiciones

Para que la invención se entienda más fácilmente, a continuación se definen específicamente determinados términos técnicos y científicos. A menos que se defina específicamente en otra parte del presente documento, todos los demás términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Como se usa en el presente documento, incluyendo en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "uno/una", "el" y "la", incluyen sus referencias plurales correspondientes a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

20 LAG3

El término "LAG3", con respecto al polipéptido al que se unen los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención, se refiere a LAG3 humana y de mono cynomolgus, p. ej., *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta* así como fragmentos de la misma tales como el fragmento maduro de la misma que carece del péptido señal.

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de LAG3 humana (Gen-3 de Activación de Linfocitos) comprende la secuencia de aminoácidos:

```
MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAIEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL QDLSLLRRAG
VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT VLSVGPGLR SGRLLQPRV
QLDERGRQRG DFLWLRLPAR RADAGEYRAA VHLRDRLSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR
ASDWILNCS FSRPDRPASV HWFRNRQGR VPVRESPPHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG
CILTIRYDGFN VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSAQAQAGT YTCHIHLEQEQ QLNATVTLAI ITVTPKSFGS
PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA QEAQLLSQPW QCQLYQGERL
LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL LLFLILGVLS LLLLVLTGAFG FHLWRRQWRP
RRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL
```

(SEQ ID NO: 443); véase también el número de acceso de Uniprot. P18627.

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de LAG3 de ratón comprende la secuencia de aminoácidos:

```
MREDLLLGLF LLGLLWEAPV VSSGPGKELP VVWAQEGAPV HLPCLSLKSPN LDPNFLRRGG
VIWQHQPDSG QPTPIPALDL HQGMPSPRQP APGRYTVLSV APGGLRSGRQ PLHPHVQLEE
RGLQRGDFSL WLRPALRTDA GEYHATVRLP NRALSCSLRL RVGQASMIAS PSGVLKLSDW
VLLNCSFSRP DRPVSVHWFO GQNRVPVYNS PRHFLAETFL LLPQVSPLDS GTWGCVLTYR
DGFNVSITYN LKVLGLEPVA PLTVYAAEGS RVELPCHLPP GVGTPSLLIA KWTTPGGGPE
LPVAGKSGNF TLHLEAVGLA QAGTYTCSIH LQGQQLNATV TLAVITVTPK SFGPLGSRGK
LLCEVTPASG KERFVWRPLN NLSRSCPGPV LEIQEARLLA ERWQCQLYEG QRLLGATVYA
AESSGAHSA RRISGDLKGG HLVLVLILGA LSLFLLVAGA FGFHWWRKQL LLRRFSALEH
GIQPFPAQRK IEELERELET EMGQEPEPEP EPQLEPEPRQ L
```

(SEQ ID NO: 444); véase también el número de acceso de Uniprot. Q61790

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de LAG3 de mono cynomolgus comprende la secuencia de aminoácidos:

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPPQPGAEIS VVWAQEGAPA QLPCSTPIPL QDLSLLRRAG
 VTWQHQPDSG PPAXAPGHFP VPGHRPAAPY SWGPRPRRYT VLSVGGGLR SGRLPLQPRV
 QLDERGRQRG DFSIWLRLPAR RADAGEYRAT VHLRDRALSC RLRLRVGQAS MTASPPGSLR
 TSDWVILNCS FSRPDRPASV HWFRSRGQGR VPVQGSPPHH LAESFLFLPH VGPMDSGLWG
 CILTYRDGFN VSIMYNLTVL GLEPATPLTV YAGAGSRVEL PCRLPPAVGT QSFLTAKWAP
 PGGGPDLLVA GDNGDFTLRL EDVSAQAGT YICHIRLQGG QLNATVTLAI ITVTPKSFGS
 PGSIGKLLCE VTPASGQEHF VWSPLNTPSQ RSFSGPWLEA QEAQLLSQPW QCQLHQGERL
 LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALRAGHL PLFLILGVLF LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP
 RRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPELEP EPELERELGP EPEPGPEPEP EQL

(SEQ ID NO: 445); véase también el número de referencia NCBI XP_005570011.1

- 5 La secuencia madura de LAG3 humana, de ratón y de mono cynomolgus, es decir, la secuencia después de la eliminación del péptido señal, comprende los aminoácidos 1-28 del SEQ ID NO: 443, 444 o 445.

Las secuencias de LAG3 pueden diferir, por ejemplo, por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas, p. ej., en donde LAG3 tiene sustancialmente la misma función biológica que la LAG3 de las SEQ ID NO: 443 o 445. Por ejemplo, las funciones biológicas de LAG3 son unirse a moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y formar homodímeros.

Una secuencia de LAG3 particular generalmente será al menos un 90 % idéntica en la secuencia de aminoácidos a LAG3 de las SEQ ID NO: 443 o 445 u otras isoformas. En determinados casos, una LAG3 puede ser al menos un 95 % o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una LAG3 de las SEQ ID NO: 443 o 445, u otras isoformas o variantes. En determinadas realizaciones, una secuencia de LAG3 no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos con respecto a la LAG3 de cualquiera de las SEQ ID NO: 443 o 445, u otras isoformas o variantes. En determinadas realizaciones, la LAG3 puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos con respecto a una LAG3 del SEQ ID NO: 443 o 445, u otras isoformas o variantes. El porcentaje de identidad se puede determinar tal como se describe en el presente documento.

Anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a LAG3 (p. ej., humana y/o de mono cynomolgus, p. ej., LAG3 de *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*) y usos de dichos anticuerpos o fragmentos. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116.

También se divulgan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a LAG3, tales como 4A10, 19E8, 11C9, 22D2, p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9, y usos de dichos anticuerpos o fragmentos.

En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 humana o de mono cynomolgus. Un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia dada (en este caso un epítipo de LAG3 humana o de mono cynomolgus) si se une a polipéptidos que comprenden la secuencia de LAG3 con una K_D de aproximadamente 1 nM o una afinidad superior (p. ej., 1 nM-2 pM, 1 nM, 100 pM, 10 pM o 2 pM), pero no se une a proteínas que carecen de la secuencia. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un polipéptido que comprende LAG3 humana o de mono cynomolgus puede unirse a una forma etiquetada con FLAG® de LAG3 humana o de mono cynomolgus pero no se unirá a otras proteínas etiquetadas con FLAG® que carecen de epítipos de LAG3.

La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 y uso de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que muestre la actividad biológica deseada. Por tanto, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos camelizados de dominio único.

La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 precursores y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y el uso de los mismos. Los "anticuerpos precursores y fragmentos de unión a antígeno de los mismos" son anticuerpos

y fragmentos que pueden modificarse para un uso previsto, tal como la humanización de un anticuerpo para su uso como fragmento o anticuerpo terapéutico humanos.

La presente invención incluye fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 y el uso de los mismos. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, es decir, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, p. ej., fragmentos que conservan una o más regiones CDR. Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; moléculas de anticuerpo monocaténario, p. ej., sc-Fv; nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La presente invención incluye fragmentos Fab anti-LAG3 y el uso de los mismos. Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y las regiones C_{H1} y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab" puede ser el producto de la escisión con papaina de un anticuerpo.

La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una región Fc y el uso de la misma. Una región "Fc" comprende dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_{H1} y C_{H2} de un anticuerpo. Los dos fragmentos de la cadena pesada se mantienen unidos mediante dos o más enlaces disulfuro y mediante interacciones hidrófobas de los dominios C_{H3}.

La presente invención incluye fragmentos Fab' anti-LAG3 y el uso de los mismos. Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una porción o un fragmento de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y el dominio C_{H1} y también la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que puede formarse un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.

La presente invención incluye fragmentos F(ab')₂ anti-LAG3 y el uso de los mismos. Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que se forma un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas. Por tanto, un fragmento F(ab')₂ está compuesto por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos mediante un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Un "fragmento F(ab')₂" puede ser el producto de la escisión con pepsina de un anticuerpo.

La presente invención incluye fragmentos Fv anti-LAG3 y el uso de los mismos. La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

La presente invención incluye fragmentos scFv anti-LAG3 y el uso de los mismos. La expresión anticuerpo "Fv monocaténario" o "scFv", se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión con el antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315. Véanse también, la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 88/01649 y las patentes de Estados Unidos N.º 4.946.778 y 5.260.203.

La presente invención incluye anticuerpos anti-dominio LAG3 y el uso de los mismos. Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunitariamente funcional que contiene únicamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H se unen covalentemente con un enlazador peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes.

La presente invención incluye anticuerpos bivalentes anti-LAG3 y el uso de los mismos. Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades antigénicas. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos (véase más adelante).

La presente invención incluye anticuerpos de dominio único camelizados anti-LAG3 y el uso de los mismos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos en el presente documento también incluyen anticuerpos de dominio único camelizados. Véase, p. ej., Muyldermans *et al.* (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann *et al.* (1999) J. Immunol. Methods 231:25; el documento WO 94/04678; el documento WO 94/25591; la Patente de Estados Unidos N.º 6.005.079). En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios V_H con modificaciones tales que se forman anticuerpos de dominio único.

La presente invención incluye diacuerpos anti-LAG3 y el uso de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L o V_L-V_H). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a

emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos de manera más completa en, p. ej., EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Holliger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448. Para una revisión de variantes de anticuerpos modificados por ingeniería véase, en general, Holliger y Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Normalmente, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención que se modifica de alguna manera conserva al menos el 10 % de su actividad de unión a LAG3 (p. ej., humana y/o de mono cynomolgus, p. ej., LAG3 de *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*) (cuando se compara con el anticuerpo precursor) cuando esa actividad se expresa sobre una base molar. Preferentemente, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención conserva al menos el 20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % o más de la afinidad de unión a LAG3 (p. ej., humana y/o de mono cynomolgus, p. ej., LAG3 de *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*) que la del anticuerpo precursor. También se pretende que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención pueda incluir sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas (denominadas "variantes conservativas o "variantes de función conservada" del anticuerpo) que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y el uso de los mismos, así como cadenas de inmunoglobulinas polipeptídicas aisladas de los mismos y polinucleótidos aislados que codifican dichos polipéptidos y vectores aislados que incluyen dichos polinucleótidos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, polipéptidos, polinucleótidos y vectores "aislados", están al menos parcialmente libres de otras moléculas biológicas de las células o del cultivo celular a partir del cual se producen. Dichas moléculas biológicas incluyen ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales, tales como restos celulares y medios de crecimiento. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno aislado puede además estar al menos parcialmente libre de componentes del sistema de expresión tales como moléculas biológicas de una célula hospedadora o del medio de crecimiento de la misma. Generalmente, el término "aislado" no pretende referirse a una ausencia total de dichas moléculas biológicas o a una ausencia de agua, tampones, o sales o componentes de una formulación farmacéutica que incluye los anticuerpos o fragmentos.

La presente invención incluye anticuerpos monoclonales anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como composiciones monoclonales que comprenden una pluralidad de anticuerpos monoclonales aislados. La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpo que comprenden la población son idénticas en la secuencia de aminoácidos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Una "pluralidad" de dichos anticuerpos monoclonales y fragmentos en una composición se refiere a una concentración de anticuerpos y fragmentos idénticos (es decir, como se analiza anteriormente, en la secuencia de aminoácidos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores) que están por encima de los que normalmente se producirían en la naturaleza, p. ej., en la sangre de un organismo hospedador tal como un ratón o un ser humano. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales incluyen normalmente una multitud de anticuerpos diferentes que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, particularmente en sus CDR, que con frecuencia son específicos para diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975) Nature 256:495 o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) Nature 352: 624-628 and Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo. See *also* Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731.

La presente invención incluye anticuerpos quiméricos anti-LAG3 (p. ej., dominio constante humano/dominio variable de ratón) y el uso de los mismos. Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que tiene el dominio variable de un primer anticuerpo y el dominio constante de un segundo anticuerpo, donde el primer y segundo anticuerpos son de diferentes especies. (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855). Normalmente, los dominios variables se obtienen de un anticuerpo de un animal experimental (el "anticuerpo precursor"), tal como un roedor y las secuencias de dominio constante se obtienen de los anticuerpos humanos, de modo que el anticuerpo quimérico resultante será menos probable que provoque una respuesta inmunitaria adversa en un sujeto humano que el anticuerpo precursor (p. ej., ratón).

La presente invención incluye anticuerpos humanizados anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., anticuerpos de ratón que se han humanizado) y el uso de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos tanto humanos como no humanos (p. ej., de ratón o rata). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina

humana.

La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 completamente humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y el uso de los mismos. La expresión "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de proteína de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma procedente de una célula de ratón. De forma similar, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de inmunoglobulina de ratón. Como alternativa, un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos de rata si se produce en una rata, en una célula de rata o en un hibridoma procedente de una célula de rata. De forma similar, "anticuerpo de rata" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de inmunoglobulina de rata. En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 completamente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo es el producto del aislamiento a partir de un animal transgénico, p. ej., un ratón (p. ej., un ratón HUMAB, véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; 5.770.429; 5.789.650; 5.814.318; 5.874.299 y 5.877.397; y Harding, *et al.*, (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 764:536-546; o un XENOMOUSE, véase, p. ej., Green *et al.*, 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23), que se ha modificado genéticamente para tener genes de inmunoglobulina completamente humanos; o el producto del aislamiento de un fago o virus que expresa las cadenas de inmunoglobulina del anticuerpo anti-LAG3 completamente humano o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En general, la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxiterminal de la cadena pesada puede definir una región constante responsable principalmente responsable de la función efectora. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Asimismo, las cadenas pesadas humanas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo, tal como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véanse, generalmente, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989).

En una realización de la invención, los anticuerpos anti-LAG3 de la presente invención comprenden una estructura tetramérica completa que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, incluyendo regiones constantes.

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por tanto, en general, un anticuerpo inalterado tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son, en general, iguales.

Normalmente, los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera comprenden tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), localizadas dentro de regiones marco (FR) relativamente conservadas. Las CDR están normalmente alineadas mediante las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. En general, del extremo N al extremo C, los dominios variables de las cadenas tanto ligera como pesada comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es, generalmente, de acuerdo con las definiciones de *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5ª ed.; NIH Publ. N.º 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917 o Chothia, *et al.*, (1989) *Nature* 342:878-883.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en el dominio variable de cadena ligera y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 en el dominio variable de cadena pesada). Véanse Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.; Johnson *et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 205-206 (que define las regiones CDR de un anticuerpo por secuencia); véase también Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chotia *et al.* *Nature* 342, 877 (1989) y Tramontano *et al.* *J. Mol. Biol.* 215, 175 (1990) (que define las regiones CDR de un anticuerpo por estructura); véase también Macallum *et al.* *J. Mol. Biol.* 1996 Oct. 11; 262(5):732-45. Como se usa en el presente documento, la expresión restos de la "región marco" o de "FR" se refiere a los restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable definidos en el presente documento como restos de CDR.

En el presente documento se divulgan anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a LAG3, que tienen cualquier combinación de CDR de las cadenas ligeras de inmunoglobulina de las SEQ ID NO: 7, 17, 27 y/o 37 y/o que tienen cualquier combinación de CDR de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de las SEQ ID NO: 2, 12, 22 y 32 en donde las CDR son como definen Kabat y Chothia (véase más arriba).

"Homología" se refiere a la similitud de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o entre dos secuencias de polipéptidos cuando están alineadas de manera óptima. Cuando en las dos secuencias comparadas, una posición está ocupada por la misma base o subunidad monomérica de aminoácidos, p. ej., si en cada una de las dos moléculas de ADN, una posición está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología es el número de posiciones homólogas compartidas por las dos secuencias dividido entre el número total de posiciones comparadas $\times 100$. Por ejemplo, si en dos secuencias, 6 de 10 de las posiciones coinciden o son homólogas cuando las secuencias están alineadas de manera óptima, entonces las dos secuencias son 60 % homólogas. Generalmente, la comparación se hace cuando dos secuencias se alinean para proporcionar el máximo porcentaje de homología.

Las "moléculas de un ácido nucleico aisladas" o "polinucleótidos aislados" (p. ej., ADN o ARN) tampoco están asociadas con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, o está unido a un polinucleótido al que está no unido por naturaleza. A efectos de la presente divulgación, ha de entenderse que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos particular, no abarca cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aisladas "que comprenden" secuencias específicas de un ácido nucleico pueden incluir, además de las secuencias específicas, secuencias codificantes para hasta diez o incluso hasta veinte o más proteínas distintas o porciones o fragmentos de las mismas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas operativamente que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de un ácido nucleico citadas y/o pueden incluir secuencias de vector. Como se analiza a continuación, la presente invención incluye polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina analizadas en el presente documento.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico o polinucleótido está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de un ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente con ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se coloca de manera que facilite la traducción. Generalmente, pero no siempre, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante conexión en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", y "línea celular", se usan indistintamente y todas estas denominaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos procedentes de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que no toda la descendencia tendrá un contenido de ADN exactamente idéntico, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la explorada en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenda hacer denominaciones distintas, estas quedaran claras a partir del contexto.

Como se usa en el presente documento, "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o técnica en la que secuencias específicas de los ácidos nucleicos, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en, p. ej., la Patente de Estados Unidos n.º 4.683.195. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá, se utiliza para diseñar cebadores de oligonucleótidos. Estos cebadores tendrán una secuencia idéntica o similar a las cadenas opuestas de la plantilla que se va a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas a partir de ADN genómico total y ADNc transcrito a partir de ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, etc. Véase, *en general*, Mullis *et al.* (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) Como se usa en el presente documento, la PCR se considera un ejemplo, pero no el único, de un método de reacción de la polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un trozo específico de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de la línea germinal" se refiere a una secuencia de secuencias de ADN de inmunoglobulina no reordenadas. Se puede usar cualquier fuente adecuada de secuencias de inmunoglobulina no reordenadas. Se pueden obtener secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, de las bases de datos de la línea germinal JOINSOLVER en el sitio web del National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases de los United States National Institutes of Health. Se pueden obtener secuencias de la línea germinal de ratón, por ejemplo, como se describe en Giudicelli *et al.* (2005) Nucleic Acids Res. 33:D256-D261.

Propiedades físicas y funcionales de los anticuerpos anti-LAG3 ilustrativos

La presente invención proporciona anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) que comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116; y el uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en el tratamiento o prevención de enfermedades. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-LAG3 de ratón o humanizados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-LAG3 antagonistas y su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades.

En el presente documento, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena ligera particular y una cadena pesada particular puede denominarse "cadena ligera/cadena pesada"; por ejemplo, un anticuerpo que comprende la cadena ligera 45AGX_22D2_VL3 y la cadena pesada humanizada x [LAG3_H] mAb.22D2_VH6 N54D puede denominarse "45AGX_22D2_VL3/humanizada x [LAG3_H] mAb.22D2_VH6 N54D".

Un "anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo" incluye cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se analiza en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) que se une específicamente a LAG3 (p. ej., LAG3 humana o de mono cynomolgus). Dichos anticuerpos y fragmentos incluyen anticuerpos humanizados y fragmentos que tienen cualquier combinación de las cadenas ligeras y pesadas de ratón o humanizadas que se exponen en el presente documento o variantes de dichas cadenas que se unen específicamente a LAG3. Dichos anticuerpos y fragmentos incluyen cualquier anticuerpo o fragmento que comprenda una o más de las CDR (p. ej., CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) de las cadenas de ratón o humanizadas expuestas en el presente documento o variantes de dichas CDR que se unen específicamente a LAG3. Asimismo, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en LAG3 al que se unen los anticuerpos y fragmentos analizados en el presente documento y cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se bloquea de forma cruzada (parcial o totalmente) o está bloqueado de forma cruzada (parcial o totalmente) por un anticuerpo o fragmento analizado en el presente documento para la unión a LAG3; así como cualquier variante de los mismos. Una realización particular de la invención incluye anticuerpos y fragmentos que comprenden solamente cadenas de inmunoglobulina de ratón o solamente cadenas de inmunoglobulina humanizadas y/o en donde las cadenas de inmunoglobulina o CDR proceden todas, directa o indirectamente, del mismo clon de ratón original, es decir, cadenas ligeras de 4A10 humanizadas emparejadas con cadenas pesadas de 4A10 humanizadas; cadenas ligeras de 19E8 humanizadas emparejadas con cadenas pesadas de 19E8 humanizadas; cadenas ligeras de 11C9 humanizadas emparejadas con cadenas pesadas de 11C9 humanizadas; o cadenas ligeras de 22D2 humanizadas emparejadas con cadenas pesadas de 22D2 humanizadas; o cadenas ligeras 4A10 de ratón emparejadas con cadenas pesadas de 4A10 de ratón; cadenas ligeras de 19E8 de ratón emparejadas con cadenas pesadas de 19E8 de ratón; cadenas ligeras de 11C9 de ratón emparejadas con cadenas pesadas de 11C9 de ratón; o cadenas ligeras de 22D2 de ratón emparejadas con cadenas pesadas de 22D2 de ratón. Estos anticuerpos y fragmentos forman parte de la presente invención junto con sus usos, p. ej., como se expone en el presente documento.

Los anticuerpos con bloqueo cruzado y fragmentos de unión a antígeno de los mismos analizados en el presente documento pueden identificarse en función de su capacidad para bloquear la unión a LAG3 de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos expuestos específicamente en el presente documento, p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2, en ensayos de unión (p. ej., interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés; p. ej., ensayo de unión de FORTEBIO OCTET; Pall ForteBio Corp; Menlo Park, CA), resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), BIACore, ELISA, citometría de flujo). Por ejemplo, en una realización de la invención, cuando se usa BLI, la punta de una sonda de fibra óptica está recubierta con ligando (p. ej., LAG3) y actúa como biosensor en donde la unión a LAG3 del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 altera el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada por la capa de la sonda unida a LAG3 y una capa de referencia interna. El cambio es indicativo de la unión LAG3/anti-LAG3. En una realización de la invención, la punta recubierta con LAG3 se sumerge en una solución de analito que contiene anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, p. ej., en el pocillo de una placa bien de 96 o de 384 pocillos. En una realización de la invención, la placa se agita durante la lectura para crear un flujo orbital. Para leer el ensayo, la luz blanca se dirige a lo largo de la fibra. Como se menciona anteriormente, la interferencia entre la luz que se refleja en la capa de referencia y las superficies inmovilizadas que contienen LAG3 de la punta crea un patrón distintivo de luz que regresa por la fibra. A medida que las moléculas se unen a la superficie del sensor inmovilizada, ese patrón cambia en proporción a la extensión de la unión. Por ejemplo, se pueden usar ensayos en los que una proteína LAG3 (p. ej., LAG3 humana) se inmoviliza en una sonda o placa de BLI, un anticuerpo o fragmento anti-LAG3 de referencia se une a LAG3 (p. ej., a una concentración de saturación) y se añade un anticuerpo o fragmento anti-LAG3 de prueba. A continuación, se determina la capacidad del anticuerpo de prueba para competir con el anticuerpo de referencia por la unión a LAG3. En el formato de BLI, se monitoriza la interferencia de luz del complejo LAG3 para determinar si el anticuerpo de prueba compite de manera eficaz con el

anticuerpo de referencia, p. ej., se monitoriza el cambio de longitud de onda de nanómetros de luz a lo largo del tiempo en donde un cambio indica unión adicional del anticuerpo de prueba y falta de bloqueo cruzado. En una realización de la invención, en el formato de BLI, se considera cualitativamente que se ha producido un bloqueo cruzado entre los anticuerpos si no se observa unión adicional del anticuerpo de prueba. En una realización de la invención, como control, se confirma el bloqueo cruzado del anticuerpo de referencia consigo mismo; en donde se determina que el ensayo funciona correctamente si el anticuerpo de referencia puede bloquear de forma cruzada consigo mismo la unión a LAG3. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2, a LAG3 (p. ej., LAG3 humana) demuestra que el anticuerpo de prueba puede bloquear de forma cruzada a Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2 para la unión a LAG3 (p. ej., LAG3 humana) y, por tanto, puede, en algunos casos, unirse al mismo epítipo en LAG3 (p. ej., LAG3 humana) que Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2. Tal como se indica anteriormente, los anticuerpos y fragmentos que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos o fragmentos anti-LAG3 de la presente invención también forman parte de la presente invención. En una realización de la invención, La BLI se realiza en un formato sándwich en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 de referencia se inmoviliza en la sonda y después se une con LAG3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 de prueba se analiza después para determinar la capacidad de bloquear la unión del anticuerpo o fragmento de referencia.

Los Anticuerpos "4A10", "19E8", "11C9" y "22D2" anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos mencionados en el presente documento comprenden la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las cadenas ligeras de inmunoglobulina de ratón 4A10, 19E8, 11C9 o 22D2 y variantes de las mismas, respectivamente; así como la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de ratón 4A10, 19E8, 11C9 o 22D2, y variantes de las mismas, respectivamente. Dichos anticuerpos y fragmentos "4A10", "19E8", "11C9" y "22D2" pueden ser anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tales como Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9.

Ejemplos de las cadenas de inmunoglobulina de los anticuerpos anti-LAG3 así como sus CDR incluyen, pero sin limitación:

secuencia V_H de 4A10

ATGAAATGCAGCTGGGTTCATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTATAGGAATCAATTCAGAGGTTTCAGCTGCTCCAGTCTGG
GGCAGAACTTGTGAGGTCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCTGCACAGCCTCTGGCTTCAACATGAAGACTACTATATGC
ACTGGATGAAACAGAGGCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATTGATCCTGTGAATGGTGATACTGAATATGCC
CCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTACACCTCAACAGCCTGACATC
TGAGGACACTGCCGCTCTATTACTGTAATTTCTATGATGGTTACCTCTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACTG
TCTCTGCA

(SEQ ID NO: 1; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

MKCSWVIFFLMAVIGINSEVQLLQSGAELVRSGASVKLSCTAS**GFNIEDYYMH**WMKQRPQGLEWIGWIDPVNGDTEYA
PKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLN**SLT**SEDTAVYYCNFYDGYLFAFWGQGLVTVSA

(SEQ ID NO: 2; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

CDR-H1: GFNIEDYYMH (SEQ ID NO: 3)
CDR-H2: WIDPVNGDTEYAPKFQG (SEQ ID NO: 4)
CDR-H3: YDGYLFAF (SEQ ID NO: 5)

secuencia V_L de 4A10

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCTTGGGGCTGCTTGCTCTGGATCCCTGGAGCCATTGGGGATATTGTGCTGACTCAGGC
TGCACCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTGTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTGATG
GCAACACTTATCTGTATTGGCTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCC
TCAGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCAGGAAGTGTTCACACTGAGAATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGA
TGTGGGTATTTATTACTGTAT**GCAACATCTAGAATATCCTTTCACGTTT**GGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAAA

(SEQ ID NO: 6; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

MRCLAEFLGLLV**WIPGAIG**DIVLTQAAPSVVPTPGESVSI**SCRSSK**SLLSHDGNTYLYWLLQRPQSPQLLIY**RM**SNLA
SGVPDRFSGSGSTVFTLRISRLAEDVGIYYC**MOHLEYPFT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 7; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

CDR-L1: RSSKSLHSDGNTYLY (SEQ ID NO: 8)
 CDR-L2: YRMSNLAS (SEQ ID NO: 9)
 CDR-L3: MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 10)

5 secuencia V_H de 19E8

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTTTTCTCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCGTTGCCAGATCCGACTGCAGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGGTCCTCCTTCACTGACTACTATATAA
ACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAAGCGGTAATTCTATCTACAAT
GAGAACTTCAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCATCTCAGCAGCCTGACATC
 TGAGGACACTGCTGTCTATTCTGTGCAAGAGAGGCTGATTACGACGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCGG

(SEQ ID NO: 11; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

10 **MGWSWIFLFLLSGTAGVRC**QIRLQSGPELVKPGASVKISCKASGSSFTDYINWVKQKPGQGLEWIGWYIPGSGNSIYN
ENFKAKATLTVDTSSTAYMHLSSLTSEDTAVYFCAREADYDDALDYWGQGTSVTVSS

(SEQ ID NO: 12; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

15 CDR-H1: GSSFTDYIN (SEQ ID NO: 13)
 CDR-H2: WIYPGSGNSIYNENFKA (SEQ ID NO: 14)
 CDR-H3: EADYDDALDY (SEQ ID NO: 15)

secuencia V_L de 19E8

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGTCACATCTTGCTGACTCAGTC
 TCCAGCCATTCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATAC
ACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
 AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCAGAAGATATTGCAGATTATTA
 CTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCAACGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

(SEQ ID NO: 16; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

20 **MVSTPQFLVFLFWIPASRGH**ILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWHYQORTNG
SPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQSNS WPTYTFGGGKLEIK

(SEQ ID NO: 17; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

25 CDR-L1: RASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 18)
 CDR-L2: YASESIS (SEQ ID NO: 19)
 CDR-L3: QQSNSWPTYT (SEQ ID NO: 20)

30 secuencia V_H de 11C9

ATGAGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCAACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGG
 GGCTGAGCTTGTGATGCCTGGGGCTTCAGCGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACACTCACTGACTACTGGATGC
ACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGCGATTGATATTTCTGATAGTTATTCTAGCTACAAT
CAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCACCAGCCTGACATC
 TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCCCTTTCTACAATAGTAGAGGGGGAACTACTTTGACTACTGGGGCC
 AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID NO: 21; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

35 **MRWSCIIILFVATATGVNS**QVQLQQPGAELVMPGASAKMSCKASGYTLTDYW
MHWVKQRPQGLEWIGAIDISDSYSSYNQKFKGKATLTVDSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARSPFYNSRGGNYFDY
 GQGTTLTVSS

(SEQ ID NO: 22; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

40 CDR-H1: GYTLTDYWMH (SEQ ID NO: 23)
 CDR-H2: AIDISDSYSSYNQKFKG (SEQ ID NO: 24)
 CDR-H3: SPFYNSRGGNYFDY (SEQ ID NO: 25)

secuencia V_L de 11C9

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCA
AGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGGTGATACGCTTCCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

5

(SEQ ID NO: 26; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTLPPWTFGGGKLEIK

10

(SEQ ID NO: 27; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

CDR-L1: RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 28)

CDR-L2: YTSRLHS (SEQ ID NO: 29)

CDR-L3: QQGDTLPPWT (SEQ ID NO: 30)

15

secuencia V_H de 22D2

ATGGGATGGACCTGGATCTTTCTCTTCTCTCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCTCTCTGAGGTCTGCTGCTACAGTCTGG
ACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAATCCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACGTGG
ACTGGGTGAAGCAGCGCCATGGAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCAAACAATGGTGGTACTATCTACAGT
CAGAAATTCAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTTCATGGAGCTCCGCAGCCTGACATC
TGAGGACACTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGAAGTATAGGTGGTTTGGTGCTATGGACCACTGGGGTCAAGGAACCTCAG
TCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTG

20

(SEQ ID NO: 31; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

MGWTWIFLFFLSGTAGVLSEVLLQLSGPELVKPGTSVKIPCKASGYTFTDYNVDWVKQRHGKLEWIGDINPN
NGGTIYSQKFKGKATLTVDKSSSTAEMELRSLTSEDYAVYFCARNYRWFGAMDHWGQGSVTVSS

25

(SEQ ID NO: 32; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33)

CDR-H2: DINPNNGGTIYSQKFKG (SEQ ID NO: 34)

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

30

secuencia V_L de 22D2

ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACATTGTGTTGACCCAATC
TCCAGCTTCTTTGGTGTGTCTCCAGGGCAGAGGGCCACCATTTCCTGCAAGGCCAGTCAAAGTCTTGATTATGAAGGTG
ATAGTGATATGAATTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTCTGGTGCATCCAATCTAGAGTCT
GGGATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTGTAAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGC
TGCAACCTATTACTGTCAAGCAAGTACTGAGGATCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTG
ATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTG
AACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCG

35

(SEQ ID NO: 36; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

METDTILLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSPGQRATISCKASQSLDYEGDSDMNWYQQKPGQPRLISGASNLES
GIPARFSGSGSDFTVNIHPVEEDAATYYCQQSTEDPRTFGGGKLEIK

40

(SEQ ID NO: 37; en donde las CDR están subrayadas y en donde la secuencia señal está en negrita)

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38)

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39)

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40)

Las cadenas pesadas o ligeras precursoras de 22D2 de ratón pueden denominarse en el presente documento

LB145.22D2.E1.1D1. Las cadenas pesadas o ligeras precursoras de 19E8 de ratón pueden denominarse en el presente documento LB148.19E8.G1.1A1. Las cadenas pesadas o ligeras precursoras de 4A10 de ratón pueden denominarse en el presente documento LB148.4A10.1H1. Las cadenas pesadas o ligeras precursoras de 11C9 de ratón pueden denominarse en el presente documento LB148.11C9.1C1.

La presente invención también incluye cualquier anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) que comprenden una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras (o variantes de las mismas) o CDR (o variantes de las mismas) o fragmentos maduros de dichas cadenas (o variantes de los mismos) o dominios variables de los mismos de dichas cadenas (o variantes de los mismos) que se exponen a continuación. Las cadenas ligeras se pueden designar con una "V_L" o "VK" y las cadenas pesadas se pueden designar con una "V_H".

Cadenas de inmunoglobulina de ratón

Las cadenas que se exponen a continuación que tienen una designación "4A10", "19E8", "11C9" o "22D2" puede denominarse como tal en el presente documento. Tal como se analiza en el presente documento, el alcance de la presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una o más (p. ej., 3) CDR de cadena ligera y/o una o más (p. ej., 3) CDR de cadena pesada de las cadenas de inmunoglobulina expuestas a continuación; o cualquier dominio variable maduro de una cadena ligera de inmunoglobulina y/o dominio variable maduro de una cadena pesada de inmunoglobulina expuestos en las SEQ ID NO: 45-104.

Cadenas humanizadas

En una realización de la invención, un anticuerpo (p. ej., antagonista humanizado) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 humanizado de la invención comprende cualquier combinación de dominios variables maduros de ligera y pesada de las siguientes cadenas de inmunoglobulina. En una realización de la invención, las cadenas ligeras de 11C9 humanizadas están emparejadas con las cadenas pesadas de 11C9 humanizadas; las cadenas ligeras de 19E8 humanizadas están emparejadas con las cadenas pesadas de 19E8 humanizadas; las cadenas ligeras de 4A10 humanizadas están emparejadas con las cadenas pesadas de 4A10 humanizadas; y las cadenas ligeras de 22D2 humanizadas se emparejan con las cadenas pesadas de 22D2 humanizadas. En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera de dominio variable de inmunoglobulina "45AGX_22D2_VL3", p. ej., que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 274 o un fragmento maduro de la misma (p. ej., los aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 274); y una cadena pesada de dominio variable de inmunoglobulina "humanizada x [LAG3_H] mAb.22D2 VH6 N54D" o "humanizada x [LAG3_H] mAb.22D2 VH6 N54G" que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 426 o SEQ ID NO: 427, respectivamente.

Las cadenas que se exponen a continuación que tienen una designación "4A10", "19E8", "11C9" o "22D2" puede denominarse como tal en el presente documento. Tal como se analiza en el presente documento, el alcance de la presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una o más (p. ej., 3) CDR de cadena ligera y/o una o más (p. ej., 3) CDR de cadena pesada de las cadenas de inmunoglobulina expuestas en el presente documento; o cualquier inmunoglobulina de dominio V_L o de cadena ligera madura o sin procesar y/o inmunoglobulina de dominio V_H o de cadena pesada madura o sin procesar expuesta en el presente documento. El alcance de la presente invención también incluye cualquiera de los polipéptidos o polinucleótidos humanizados o dominios variables de los mismos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales o eliminaciones puntuales.

La divulgación incluye cualquier anticuerpo anti-LAG3 humanizado y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenda las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina expuestas a continuación o cualquier anticuerpo o fragmento que tenga las CDR de cadena ligera y pesada de los mismos (p. ej., IgG1 o IgG4). Dichos anticuerpos y fragmentos pueden denominarse como cualquiera de Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9 como se indica a continuación:

- **Ab1:** cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 53AHH humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 VH6) IgG1/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); comprendiendo, por ejemplo:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQQLIYGASNLESQVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSTSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y

una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 106); o

un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVG VYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT TTVTVSS

(aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 106 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 458); y
CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- Ab2: cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LBI45.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 56AHH Humanizada x [LAG3_H] mAb (LBI45.22D2.E1 .D1 VH6 N55S) IgG1/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); por ejemplo: que comprende:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVG VYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y

una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 108); o

un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVG VYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTTVTVSS

- 5 (aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 108 (CDR subrayadas))
; o que comprende las CDR:

10 CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNSGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 456); y
CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- 15 • Ab3: cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LBI45.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 54AHH Humanizada x [LAG3_H] mAb (LBI45.22D2.E1.D1 VH6 N55D) IgG1/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); ; comprendiendo, por ejemplo:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

20 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126)

una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

25 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNDGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 30 (SEQ ID NO: 110); o
un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

- 35 (aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y
un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNDGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTTVTVSS

- 40 (aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 110 (CDR subrayadas))
; o que comprende las CDR:

45 CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNDGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 457); y
CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- 50 • Ab4: cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LBI45.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 52AHH Humanizada x [LAG3_H] mAb (LBI45.22D2.E1.D1 VH6 N55Q) IgG1/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); ; comprendiendo, por ejemplo:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESQVDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 (aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y

una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

(SEQ ID NO: 112); o

un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESQVDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGTKVEIK

15

(aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

20

(aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 112 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

25

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);

CDR-H2: DINPNQGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 455); y

30

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- **Ab5:** cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 57AHH humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 VH6) IgG4 S228P (PX) (o el dominio variable del mismo); ; comprendiendo, por ejemplo:

35

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESQVDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

45

(SEQ ID NO: 114); o

un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVIYCCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y
un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 114 (CDR subrayadas))
; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 458); y
CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- **Ab6:** cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 73AHD humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 VH6 N55D/VL3) IgG4 S228P/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); comprendiendo, por ejemplo:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVIYCCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y
una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNDGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 116); o
un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVIYCCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y
un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNDGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116 (CDR subrayadas))
; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNDGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 457); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- **Ab7:** cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 21AHG humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1 .D1 VH6 N55S/VL3) IgG4 S228P/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); comprendiendo, por ejemplo:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y

una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 118); o

un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 118 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNSGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 456); y
CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

- **Ab8:** cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 80AHG humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1 .D1 VH6 N55Q/VL3) IgG4 S228P/Kappa (PX) (o el dominio variable del mismo); comprendiendo, por ejemplo:

una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y

una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARNYRWF GAMDHWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLK

- 5 (SEQ ID NO: 120); o
un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

- 10 (aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y
un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARNYRWF GAMDHWGQGT TTVTVSS

- 15 (aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 120 (CDR subrayadas))
; o que comprende las CDR:

- 20 CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 38);
CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
CDR-H2: DINPNQGGTIYAQKFQ (SEQ ID NO: 455); y
CDR-H3: NYRWF GAMDH (SEQ ID NO: 35)

- 25 o
• **Ab9:** cadena ligera humanizada 45AGX humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VL3)) Kappa (PX) (o el dominio variable de la misma) y cadena pesada humanizada 72AHD humanizada x [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1 .D1 VH6 N55G/VL3) IgG4 S228P/Kappa (PX)) (o el dominio variable del mismo); comprendiendo, por ejemplo:

- 30 una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 35 (aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126); y
una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLIEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARNYRWF GAMDHWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLK

- 40 (SEQ ID NO: 122); o
un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

- 45 (aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 (CDR subrayadas)); y
un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNGGGTIYAQKFQERVTTITVDKSTSTAY
 MELSSLRSED~~TAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT~~TVTVSS

(aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 122 (CDR subrayadas))
 ; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 38);
 CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 39);
 CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 40);
 CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 33);
 CDR-H2: DINPNGGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 454); y
 CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 35)

La CDR-H2 de cualquier anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos:
 DINPNX₁GGTIYX₂QKFX₃X₄ (SEQ ID NO: 446)
 en donde,

X₁= D, N, S o Q
 X₂= A o S
 X₃= Q o K
 X₄=E o G

Las cadenas pesadas de inmunoglobulina humanizadas se exponen en las SEQ ID NO: 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 124, 128, 134, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 234, 235, 237, 239, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 406-419, 448, 449, 462 y 463. El ADN que codifica las cadenas pesadas de inmunoglobulina humanizadas se expone en las SEQ ID NO: 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 127, 133, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 233, 236, 238, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396 y 398.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulina humanizadas se exponen en las SEQ ID NO: 126, 130, 132, 136, 138, 208, 210, 224, 226, 228, 230, 232, 241, 257, 259, 261, 263, 351, 369, 371, 373, 375, 401, 403, 405, 450-453, 426, 427 y 459-461. El ADN que codifica las cadenas ligeras de inmunoglobulina humanizadas se expone en las SEQ ID NO: 125, 129, 131, 135, 137, 207, 209, 223, 225, 227, 229, 231, 240, 256, 258, 260, 262, 350, 368, 370, 372, 374, 400, 402 y 404.

Una "variante" de un polipéptido, tal como una cadena de inmunoglobulina, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 70-99,9 % (p. ej., 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 %) idéntica o similar a una secuencia de aminoácidos de referencia que se expone en el presente documento; cuando la comparación se realiza mediante un algoritmo BLAST en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias correspondientes en toda la longitud de las secuencias de referencia correspondientes (p. ej., umbral de espera: 10; tamaño de palabra: 3; coincidencias máximas en un intervalo de consulta: 0; matriz BLOSUM 62; costes de hueco: existencia 11, extensión 1; ajuste de la matriz de puntuación composicional condicional).

Una "variante" de un polinucleótido se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente un 70-99,9 % (p. ej., 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia que se expone en el presente documento; cuando la comparación se realiza mediante un algoritmo BLAST en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias correspondientes en toda la longitud de las secuencias de referencia correspondientes (p. ej., umbral de espera: 10; tamaño de palabra: 28; coincidencias máximas en un intervalo de consulta: 0; puntuaciones de coincidencia/falta de coincidencia: 1, -2; costes de hueco: lineal).

Los polipéptidos y anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., anticuerpos humanizados) divulgados en el presente documento incluyen una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene al menos un 78,99 % (p. ej., 79 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %) de identidad de secuencia

de aminoácidos con los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 106; y/o una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene al menos un 78,38 % (p. ej., 79 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1-111 del SEQ ID NO: 224.

Además, una variante puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en el presente documento, excepto por una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) mutaciones tales como, por ejemplo, mutaciones sin sentido (p. ej., sustituciones conservativas), mutaciones sin sentido, eliminaciones o inserciones. Dicho un polipéptido puede ser una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina y/o una CDR (p. ej., una cualquiera o más de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y/o CDR-H3).

Tal como se analiza en el presente documento, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una o más variantes de las secuencias marco (p. ej., una cualquiera o más de FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, FR-H1, FR-H2, FR-H3 y/o FR-H4), CDR (p. ej., 1, 2 o 3 CDR-L variantes y/o 1, 2 o 3 CDR-H variantes) y/o cadenas de inmunoglobulina (p. ej., 1 o 2 V_L variantes y/o 1 o 2 V_H variantes) cuyas secuencias se exponen específicamente en el presente documento. Tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden, por sí solos, denominarse variantes. También se divulgan cadenas polipeptídicas simples, que incluyen una o más FR, CDR-L, CDR-Hs y/o cadenas de inmunoglobulinas variantes. También se divulgan polinucleótidos que codifican tales cadenas polipeptídicas variantes. Por ejemplo, en el presente documento se divulgan anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la V_H y V_L de los anticuerpos Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9, que se exponen en el presente documento, así como las variantes de los mismos que comprenden la CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de dicho Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9 pero que comprende el 70 % o más (p. ej., 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %) de identidad o similitud total de secuencia de aminoácidos con dichas V_H y V_L de Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9. Por tanto, en dichas realizaciones, las CDR de los anticuerpos y los fragmentos son idénticas a las de las V_H y V_L de Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9, pero cualquier diferencia con V_H y V_L se produce en las regiones marco y/o en los dominios constantes de inmunoglobulina.

También se divulgan anticuerpos anti-LAG3 variantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) que comprenden una o más CDR variantes (p. ej., una o más de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y/o CDR-H3) y/o regiones marco (p. ej., una cualquiera o más de FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que se exponen en el presente documento; y/o uno o más dominios V_L variantes y/o uno o más dominios V_H variantes de dichos anticuerpos o fragmentos que se exponen en el presente documento, por ejemplo, con al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de identidad de secuencia o similitud con, p. ej., las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 426, 427, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 446, 448, 449, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463 o 464; que se unen específicamente a LAG3.

Como se analiza anteriormente, la divulgación incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 variantes que comprenden una o más CDR (p. ej., 1, 2 o 3 CDR-L variantes y/o 1, 2 o 3 CDR-H variantes); y/o regiones marco variantes (p. ej., una o más de FR1, FR2, FR3 y/o FR4) y/o dominios V_L variantes y/o V_H variantes (con o sin una secuencia señal) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones. Las mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales que son sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas o eliminaciones puntuales, por ejemplo en una región marco y/o en una CDR. Como se analiza anteriormente, la divulgación proporciona anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden la CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9 pero que tienen mutaciones en las regiones marco de los mismos.

Los anticuerpos anti-LAG3 variantes modificados de forma conservativa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos también son parte de la presente invención. Una "variante modificada de forma conservativa" o una "sustitución conservativa" se refiere a una variante en donde hay una o más sustituciones de aminoácidos en un polipéptido con otros aminoácidos que tienen características similares (p. ej., carga, tamaño de cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofiliidad, conformación y rigidez de la cadena principal, etc.). Estos cambios se pueden realizar con frecuencia sin alterar de manera significativa la actividad biológica del anticuerpo o fragmento. Los expertos en esta materia reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 (4^a Ed.)). Además, las sustituciones de aminoácidos estructural o funcionalmente similares tienen menos probabilidades de alterar la actividad biológica de manera significativa. Los

anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 variantes analizados en el presente documento comprenden una o más CDR (p. ej., 1, 2 o 3 CDR-L variantes y/o 1, 2 o 3 CDR-H variantes); regiones marco (p. ej., una cualquiera o más de FR1, FR2, FR3 y/o FR4); y/o cadenas de inmunoglobulina que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, tales anticuerpos y fragmentos pueden comprender las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento, p. ej., las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 426, 427, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 446, 448, 449, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463 o 464; en donde dichas secuencias de aminoácidos pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más sustituciones conservativas de aminoácidos de las mismas. Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1. Sustituciones conservativas de aminoácidos ilustrativas

Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

También se divulgan variantes de función conservativa de los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cualquiera de las variantes de los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (como se analiza en el presente documento) pueden ser "variantes de función conservativa". Tales variantes de función conservativa también pueden caracterizarse, en algunos casos, como variantes modificadas de forma conservativa. "Variantes de función conservativa", como se usa en el presente documento, se refiere a variantes de los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que uno o más restos de aminoácidos (p. ej., de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR y/o de una V_L y/o de una V_H) se han cambiado sin alterar significativamente una o más propiedades funcionales del anticuerpo o fragmento. Un anticuerpo anti-LAG3 variante de función conservativa y fragmentos de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) pueden comprender una variante de una cadena de inmunoglobulina (p. ej., una o dos variantes V_H y/o una o más variante V_L s) y/o de una CDR (p. ej., 1, 2 o 3 CDR-L variantes y/o 1, 2 o 3 CDR-H variantes) de cualquiera de las expuestas en el presente documento, p. ej., cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 426, 427, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 446, 448, 449, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461,

462, 463 o 464; que muestran una o más de las siguientes propiedades funcionales:

- inhibe la unión de LAG3 a moléculas MHC de clase II, p. ej., en células Daudi; por ejemplo inhibe la unión LAG3 humana/MHC de clase II en células Daudi con una CI_{50} de aproximadamente 1,9-2,9 nM, p. ej., 2,1 nM, 2,8 nM, 2,0 nM, 1,9 nM, 2,5 nM, 2,6 nM, 2,1 nM, 2,4 nM o 2,5 nM. (p. ej., aproximadamente 2,1-2,6 nM).
- compite con las moléculas MHC de clase II por la unión de LAG3, p. ej., en células Daudi;
- se une al bucle adicional de LAG3;
- se une a LAG3 con una K_D de afinidad de aproximadamente $10^{-9}M$ hasta aproximadamente $2 \times 10^{-12}M$ (p. ej., medida por resonancia de plasmón superficial o KinExA); por ejemplo, se une a LAG3 humana con una K_D de aproximadamente 2, 3, 6, 10 u 11 pM (p. ej., 2-11 pM) y/o se une a LAG3 de mono cynomolgus con una K_D de aproximadamente 11, 12, 16 o 25 pM (p. ej., 11-25 pM), p. ej., por KinExA;
- se une a LAG3 natural en la superficie de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ activados; por ejemplo, se une a los linfocitos T CD4+ humanos que expresan LAG3 humana con una CE_{50} de aproximadamente 39, 41 o 57 pM (p. ej., aproximadamente 39-57 pM); se une a los linfocitos T CD8+ humanos que expresan LAG3 humana con una CE_{50} de aproximadamente 33, 35 o 49 pM (p. ej., aproximadamente 33-49 pM); se une a los linfocitos T CD4+ de mono cynomolgus que expresan LAG3 de mono cynomolgus con una CE_{50} de aproximadamente 27, 30 o 35 pM (p. ej., aproximadamente 27-35 pM); se une a los linfocitos T CD8+ de mono cynomolgus que expresan LAG3 de mono cynomolgus con una CE_{50} de aproximadamente 30, 31 o 41 pM (p. ej., aproximadamente 30-41 pM); por ejemplo, en donde los linfocitos T se aíslan de la sangre;
- Se une a LAG3 humana y/o de mono cynomolgus, p. ej., *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*;
- inhibe la homodimerización de LAG3;
- estimula la producción de IL-2 por linfocitos T específicos de antígeno, p. ej., producción de IL2 a partir del hibridoma de linfocitos T murinos 3A9 que expresa LAG3 humana con una CE_{50} de aproximadamente 1,06-1,65 nM, 1,74-1,83 nM, 3,56-4,06 nM, 2,83-2,96 nM, 0,57-1,07 nM, 0,45-1,27 nM, 0,47-1,01 nM o 0,72-1,08 nM;
- marca el tejido de las amígdalas; y/o
- potencia la activación de linfocitos T por anticuerpos anti-PDI tales como pembrolizumab, p. ej., aumenta la producción de IL-2 por los linfocitos T;
- no marca el tejido de cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas y/o hipofisiario.
- se une a LAG3 humana poniendo en contacto los restos QEGAPAQL (aminoácidos 35-42 del SEQ ID NO: 443) y RPARRADAGEYRAAVH (aminoácidos 137-152 del SEQ ID NO: 443) y, opcionalmente, los restos DERGRQRGDFSLW (aminoácidos 123-135 del SEQ ID NO: 443) de LAG3; o los restos SPTIPLQDL (aminoácidos 45-53 del SEQ ID NO: 443) y, opcionalmente DERGRQRGDFSL (aminoácidos 123-134 del SEQ ID NO: 443) de LAG3; o los restos HPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVL (aminoácidos 78-102 del SEQ ID NO: 443) de LAG3; y/o protegiendo los hidrógenos de la cadena principal de amida de dichos restos del intercambio con un deuterio (p. ej., de D_2O).

La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 que comprende administrar, a un animal hospedador no humano (p. ej., ratón, conejo, camello, llama o rata), una cantidad eficaz de uno o más péptidos que comprenden, que consisten en o que consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en QEGAPAQL (aminoácidos 35-42 del SEQ ID NO: 443); RPARRADAGEYRAAVH (aminoácidos 137-152 del SEQ ID NO: 443); DERGRQRGDFSLW (aminoácidos 123-135 del SEQ ID NO: 443); SPTIPLQDL (aminoácidos 45-53 del SEQ ID NO: 443); DERGRQRGDFSL (aminoácidos 123-134 del SEQ ID NO: 443); y HPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVL (aminoácidos 78-102 del SEQ ID NO: 443), p. ej., en donde el péptido se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el anticuerpo o fragmento se aísla del animal hospedador, p. ej., del suero o sangre del animal hospedador. Opcionalmente, al animal hospedador se le administra más de una dosis del péptido. Dichos péptidos aislados son parte de la presente invención, p. ej., fusionados a un inmunógeno tal como hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), albúmina de suero humano o albúmina de suero bovino.

La identidad de secuencia se refiere al grado en el que los aminoácidos de dos polipéptidos son iguales en posiciones equivalentes cuando las dos secuencias están alineadas de manera óptima. La similitud de secuencia incluye restos idénticos y aminoácidos no idénticos, bioquímicamente relacionados. A continuación se analizan los aminoácidos bioquímicamente relacionados que comparten propiedades similares y que pueden ser intercambiables.

Las siguientes referencias se refieren a algoritmos BLAST que se utilizan con frecuencia para el análisis de secuencias: ALGORITMOS BLAST: Altschul *et al.* (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; SISTEMAS DE PUNTUACIÓN DE ALINEACIÓN: Dayhoff, M.O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, supl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), págs. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships" en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, supl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), págs. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; DATOS ESTADÍSTICOS DE ALINEACIÓN: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin,

S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments" en Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) págs. 1-14, Plenum, Nueva York.

5 Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) pueden comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas de inmunoglobulina divulgadas en el presente documento (en donde 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las CDR son, opcionalmente, variantes de las expuestas en el presente documento). Las una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR se pueden seleccionar independientemente de las
10 secuencias CDR de las diversas cadenas de inmunoglobulina divulgadas en el presente documento. Como alternativa, las una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR pueden seleccionarse de las secuencias CDR de un único anticuerpo descrito.

Por ejemplo, en el presente documento se divulgan anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los
15 mismos, así como cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina que comprenden:

- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 4A10;
- la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 4A10;
- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 11C9;
- 20 • la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 11C9;
- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 19E8;
- la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 19E8;
- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 22D2; y/o
- la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 22D2; en donde las CDR de 4A10, 11C9, 19E8 y 22D2 pueden proceder de las
25 cadenas de inmunoglobulinas de 4A10, 11C9, 19E8 y 22D2 de ratón o humanizadas, respectivamente, expuestas en el presente documento (p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9).

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3
30 de V_H de 4A10 (p. ej., SEQ ID NO: 2); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 3 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 4 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 5 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del
35 V_L de 4A10 (p. ej., SEQ ID NO: 7); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 8 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 9 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 10 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3
45 de V_H de 19E8 (p. ej., SEQ ID NO: 12); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 13 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 14 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 15 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de
50 V_L de 19E8 (p. ej., SEQ ID NO: 17); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 18 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 19 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 20 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3
60 de V_H de 11C9 (p. ej., SEQ ID NO: 22); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 23 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 24 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 25 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del V_L de 11C9 (p. ej., SEQ ID NO: 27); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 28 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 29 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 30 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 de V_H de 22D2 (p. ej., SEQ ID NO: 32, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 o 122); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 33 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 34, 446, 454, 455, 456, 457, o 458 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 35 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

Los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender al menos un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una o más (p. ej., 3) de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de V_L de 22D2 (p. ej., SEQ ID NO: 37 o 126); p. ej., en donde las CDR comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en el SEQ ID NO: 38 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 39 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 40 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), respectivamente.

También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 4A10; y la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 4A10;
- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 11C9; y la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 11C9;
- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 19E8; y la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 19E8; o
- la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 22D2; y la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 22D2; en donde las CDR de 4A10, 11C9, 19E8 y 22D2 pueden proceder de las cadenas de inmunoglobulinas de 4A10, 11C9, 19E8 y 22D2 de ratón o humanizadas, respectivamente, expuestas en el presente documento, y en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las CDR son variantes de las expuestas en el presente documento.

También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del V_L de 4A10 (p. ej., las SEQ ID NO: 8 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 9 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 10 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)); y un dominio variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del V_H de 4A10 (p. ej., las SEQ ID NO: 3 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 4 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 5 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)).

Un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender un dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del V_L de 19E8 (p. ej., las SEQ ID NO: 18 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 19 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 20 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)); y un dominio variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del V_H de 19E8 (p. ej., las SEQ ID NO: 13 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 14 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 15 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)).

Un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender un dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del V_L de 11C9 (p. ej., las SEQ ID NO: 28 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 29 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 30 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)); y un dominio variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del V_H de 11C9 (p. ej., las SEQ ID NO: 23 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10

mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 24 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 25 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)).

5 Un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender un dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del V_L de 22D2 (p. ej., las SEQ ID NO: 38 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 39 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 40 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)); y un dominio variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del V_H de 22D2 (p. ej., las SEQ ID NO: 33 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), 34, 446, 454, 455, 456, 457 o 458 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales), y 35 (o una variante de la misma que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones puntuales y/o eliminaciones puntuales)).

15 En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG3 antagonista humanizado. Ejemplos de tales anticuerpos anti-LAG3 humanizados incluyen, pero sin limitación, los que comprenden la CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de 4A10; y la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 4A10.

20 En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG3 antagonista humanizado. Ejemplos de tales anticuerpos anti-LAG3 humanizados incluyen, pero sin limitación, los que comprenden la CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de 19E8; y la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 19E8

25 En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG3 antagonista humanizado. Ejemplos de tales anticuerpos anti-LAG3 humanizados incluyen, pero sin limitación, los que comprenden la CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de 11C9; y la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 11C9.

30 En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG3 antagonista humanizado. Ejemplos de tales anticuerpos anti-LAG3 humanizados incluyen, pero sin limitación, los que comprenden la CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de 22D2; y la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 22D2; por ejemplo, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo o un polipéptido de inmunoglobulina que comprende:

- 35 • el dominio V_L de inmunoglobulina de 4A10 maduro y/o el dominio V_H de 4A10 maduro;
- el dominio V_L de inmunoglobulina de 19E8 maduro y/o el dominio V_H de 19E8 maduro;
- el dominio V_L de inmunoglobulina de 11C9 maduro y/o el dominio V_H de 11C9 maduro; y/o
- el dominio V_L de inmunoglobulina de 22D2 maduro y/o el dominio V_H de 22D2 maduro; en donde el dominio V_L o V_H de 4A10, 19E8, 11C9 y 22D2 es un dominio V_L o V_H de 4A10, 19E8, 11C9 y 22D2 expuesto en el presente documento, y en donde, opcionalmente, el V_L y/o V_H es una variante de un V_L o V_H expuesto en el presente documento (p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9).

45 También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio V_L maduro de 4A10, 19E8, 11C9 o 22D2 en donde el dominio V_L comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 59, 61, 63, 65, 101, 126, 130, 132, 136, 138, 208, 210, 224, 226, 228, 230, 232, 241, 257, 259, 261, 263, 351, 369, 371, 373, 375, 401, 403, 405, 426, 427, 450-453 o 459-461 o una variante de las mismas.

50 También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio V_H maduro de 4A10, 19E8, 11C9 o 22D2 en donde el dominio V_H comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 128, 134, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 234, 235, 237, 239, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 406-419, 434-442, 448, 449, 462, 463 o 464; o una variante del mismo.

60 También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio V_L maduro de 4A10 (p. ej., los aminoácidos 21-132 del SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma) y el dominio V_H maduro de 4A10 (p. ej., los aminoácidos 20-136 del SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma).

65 También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio V_L maduro de 19E8 (p. ej., los aminoácidos 21-128 del SEQ ID NO: 17 o una variante de la misma) y el dominio V_H maduro de 19E8 (p. ej., los aminoácidos 20-138 del SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma).

misma).

También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio V_L maduro de 11C9 (p. ej., los aminoácidos 21-128 del SEQ ID NO: 27 o una variante de la misma) y el dominio V_H maduro de 11C9 (p. ej., los aminoácidos 20-142 del SEQ ID NO: 22 o una variante de la misma).

También se divulga en el presente documento un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio V_L maduro de 22D2 (p. ej., aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 37 o 126 o una variante de la misma) y el dominio V_H maduro de 22D2 (p. ej., los aminoácidos 21-138 o 21-131 del SEQ ID NO: 32, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 o 122 o una variante de las mismas).

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 20-136 de la misma o una variante de la misma; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 21-132 de la misma o una variante de la misma; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 12 o los aminoácidos 20-138 de la misma o una variante de la misma; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 17 o los aminoácidos 21-128 de la misma o una variante de la misma; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 22 o los aminoácidos 20-142 de la misma o una variante de la misma; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 27 o los aminoácidos 21-128 de la misma o una variante de la misma; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 32, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 o 122 o un fragmento maduro de las mismas, p. ej., que comprende los aminoácidos 20-138 o 20-131 de las mismas; o una variante de la mismas; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 37 o 126 o un fragmento maduro de las mismas, p. ej., que comprende los aminoácidos 21-131 de las mismas o una variante de las mismas; o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de un dominio V_H que comprenden el SEQ ID NO: 2 (p. ej., las SEQ ID NO: 3-5); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de un dominio V_L que comprenden el SEQ ID NO: 7 (p. ej., las SEQ ID NO: 8-10); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de un dominio V_H que comprenden el SEQ ID NO: 12 (p. ej., las SEQ ID NO: 13-15); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de un dominio V_L que comprenden el SEQ ID NO: 17 (p. ej., las SEQ ID NO: 18-20); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que

comprenden la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de un dominio V_H que comprendel SEQ ID NO: 22 (p. ej., las SEQ ID NO: 23-25); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

5 También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de un dominio V_L que comprendel SEQ ID NO: 27 (p. ej., las SEQ ID NO: 28-30); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

10 También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de un dominio V_H que comprendel SEQ ID NO: 32, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 o 122 (p. ej., las SEQ ID NO: 33, 34 (o 446, 454, 455, 456, 457 o 458) o 35); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

15 También se divulgan en el presente documento polipéptidos (p. ej., una cadena de inmunoglobulina humanizada) que comprenden la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de un dominio V_L que comprendel SEQ ID NO: 37 o 126 (p. ej., las SEQ ID NO: 38-40); o cualquier polinucleótido que codifique dicho polipéptido. Opcionalmente, 1, 2 o 3 de dichas CDR son variantes de la secuencia expuesta en el presente documento.

20 La presente invención incluye composiciones cristalinas de los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención.

Polinucleótidos

25 También se divulgan en el presente documento los polinucleótidos que codifican cualquiera de los polipéptidos o cadenas de inmunoglobulina de anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (incluidas variantes de las cadenas de aminoácidos expuestas específicamente en el presente documento). Por ejemplo, la presente invención incluye los polinucleótidos descritos en las SEQ ID NO: 1, 30 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 35 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402 o 404 y variantes de las mismas (p. ej., que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95% o 99 % de identidad de secuencia BLAST con dichas secuencias de nucleótidos (como se analiza anteriormente)); y polinucleótidos que 40 codifican los aminoácidos descritos en las mismas, p. ej., en las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 45 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 426, 427, 434, 435, 436, 50 437, 438, 439, 440, 441, 442, 446, 448, 449, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463 o 464. La divulgación también incluye polinucleótidos variantes que se hibridan con cualquiera de dichos polinucleótidos.

Asimismo, la divulgación incluye anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina (p. ej., regiones variables de las mismas) y/o CDR de 55 cadena pesada y ligera codificadas por los polinucleótidos expuestos en el presente documento.

Por ejemplo, en el presente documento se divulgan anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina codificada por un polinucleótido que comprende la 60 secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 107 (o que codifica un dominio variable de la misma) y una cadena ligera de inmunoglobulina codificada por el secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 125 (o que codifica un dominio variable de la misma). Por ejemplo, en el presente documento se divulgan anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina codificada por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 115 (o que codifica un dominio variable de la misma) y una cadena ligera de inmunoglobulina codificada por el secuencia de nucleótidos 65 expuesta en el SEQ ID NO: 125 (o que codifica un dominio variable de la misma).

También se divulga en el presente documento un polinucleótido que codifica el

- V_L de 4A10 o un fragmento maduro del mismo;
- V_H de 4A10 o un fragmento maduro del mismo;
- 5 • V_L de 19E8 o un fragmento maduro del mismo;
- V_H de 19E8 o un fragmento maduro del mismo;
- V_L de 11C9 o un fragmento maduro del mismo;
- V_H de 11C9 o un fragmento maduro del mismo;
- V_L de 22D2 o un fragmento maduro del mismo; y/o
- 10 • V_H de 22D2 o un fragmento maduro del mismo; en donde el dominio V_L o V_H de 4A10, 19E8, 11C9 y 22D2 es un dominio V_L o V_H de 4A10, 19E8, 11C9 y 22D2 expuesto en el presente documento, y en donde, opcionalmente, el V_L y/o V_H es una variante de un V_L o V_H expuesto en el presente documento.

- 15 También se divulga en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 1 o los nucleótidos 58-408 de la misma; o una variante del mismo.

También se divulga en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 6 o los nucleótidos 61-396 de la misma; o una variante del mismo.

- 20 También se divulga en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 11 o los nucleótidos 58-414 de la misma; o una variante del mismo.

También se divulgan en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 16 o los nucleótidos 61-384 de la misma; o una variante del mismo.

- 25 También se divulgan en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 21 o los nucleótidos 58-426 de la misma; o una variante del mismo.

- 30 También se divulgan en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 26 o los nucleótidos 61-384 de la misma; o una variante del mismo.

También se divulgan en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 31 o los nucleótidos 61-447 de la misma; o una variante del mismo.

- 35 También se divulgan en el presente documento un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 36 o los nucleótidos 61-547 de la misma; o una variante del mismo.

- 40 Los polinucleótidos variantes expuestos en el presente documento incluyen aquellos que se hibridan en condiciones de rigurosidad baja, moderada o alta para los polinucleótidos expuestos en el presente documento o para polinucleótidos que codifican los polipéptidos expuestos en el presente documento, y codifican cadenas de inmunoglobulina de anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que mantienen la capacidad de unirse específicamente a LAG3 (humana y/o de mono cynomolgus, p. ej., *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*). Una primera molécula de polinucleótido "se puede hibridar" con una segunda molécula de polinucleótido cuando una forma monocatenaria de la primera molécula de polinucleótido puede emparejarse con la segunda
- 45 molécula de polinucleótido en las condiciones adecuadas de temperatura y fuerza iónica de la solución (véase Sambrook, *et al.*, *supra*. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Las condiciones normales de hibridación de rigurosidad baja incluyen 55 °C, SSC 5X, SDS al 0,1% y sin formamida; o con formamida al 30 %, SSC 5X, SDS al 0,5 % a 42 °C. Las condiciones normales de hibridación de rigurosidad moderada son formamida al 40 %, con SSC 5X o 6X y SDS al 0,1 % a 42 °C. Las condiciones de hibridación de
- 50 rigurosidad alta son formamida al 50 %, SSC 5X o 6X a 42 °C u, opcionalmente, a una temperatura más alta (p. ej., 57 °C, 59 °C, 60 °C, 62 °C, 63 °C, 65 °C o 68 °C). En general, el SSC es NaCl 0,15 M y citrato de Na 0,015 M. La hibridación requiere que los dos polinucleótidos contengan secuencias complementarias, aunque, dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, los desapareamientos entre bases son posibles. La rigurosidad apropiada para hibridar polinucleótidos depende de la longitud de los polinucleótidos y del grado de complementación, variables bien
- 55 conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será la rigurosidad con la que pueden hibridarse los ácidos nucleicos. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular la temperatura de fusión (véase Sambrook, *et al.*, *supra*, 9,50-9,51). Para la hibridación con polinucleótidos más cortos, p. ej., oligonucleótidos, la posición de los desapareamientos se vuelve más importante y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook, *et al.*, *supra*,
- 60 11,7-11,8).

- En otra realización de la invención, un polinucleótido, p. ej., ADN, que codifica las cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 expuestos en el presente documento forma parte de la presente invención. En una realización, el polinucleótido codifica al menos un dominio variable de
- 65 cadena ligera (V_L) de polipéptido de inmunoglobulina maduro y al menos un dominio variable de cadena pesada (V_H) de polipéptido de inmunoglobulina maduro, en donde el dominio V_L comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que

tienen una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 8-10, 18-20 28-30 y 38-40 y el dominio V_H comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que tienen una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 3-5, 13-15, 23-25 y 33-35. En una realización, el ácido nucleico codifica las secuencias de la región variable de cadena ligera madura de 4A10, 11C9, 19E8 o 22D2 y/o de la región variable de cadena pesada madura de 4A10, 11C9, 19E8 o 22D2. En algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido codifica tanto una cadena ligera como una cadena pesada en una sola molécula de polinucleótido, y, en otras realizaciones de la invención, las cadenas ligeras y pesadas están codificadas en moléculas de polinucleótidos separadas, p. ej., en células hospedadoras separadas o comunes. En otra realización, los polinucleótidos codifican además una secuencia señal.

10 El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del SEQ ID NO: 7. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del SEQ ID NO: 17. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

15 El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del SEQ ID NO: 27. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

20 El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del SEQ ID NO: 37 o 126. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del SEQ ID NO: 2. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

25 El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del SEQ ID NO: 12. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

30 El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del SEQ ID NO: 22. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

35 El polinucleótido puede codificar un dominio variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina maduro que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del SEQ ID NO: 32, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 o 122. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

El polinucleótido puede codificar el dominio variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina del SEQ ID NO: 7, 17, 27 y/o 37. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

40 El polinucleótido puede codificar el dominio variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina del SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 y/o 122. También se divulgan variantes de dichos polinucleótidos.

Esta presente invención también proporciona vectores, p. ej., vectores de expresión, tales como plásmidos, que comprende los polinucleótidos de la invención, en donde el polinucleótido está unido operativamente a secuencias de control que son reconocidas por una célula hospedadora cuando la célula hospedadora se transfecta con el vector. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden un polinucleótido (p. ej., integrado en el genoma, p. ej., un cromosoma, de la célula hospedadora) o vector de la presente invención y métodos para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o polipéptido divulgados en el presente documento que comprenden cultivar una célula hospedadora que alberga un vector de expresión o polinucleótido que codifica las cadenas de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en medio de cultivo, y aislar el antígeno o fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula hospedadora o medio de cultivo.

Afinidad de unión

55 A modo de ejemplo, y sin limitación, los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento se unen a LAG3 humana y/o de mono cynomolgus, p. ej., *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*, p. ej., con un valor de K_D de al menos aproximadamente 100 nM (1×10^{-7} M); de al menos aproximadamente 10 nM; o al menos aproximadamente 1 nM. En realizaciones adicionales, los anticuerpos tienen valores de K_D de al menos aproximadamente 200 pM (2×10^{-10} M), 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o incluso 2 pM. Por ejemplo, la K_D es aproximadamente $2,77 \times 10^{-12}$ M, $1,47 \times 10^{-11}$ M, $1,47 \times 10^{-9}$ M, o $9,03 \times 10^{-11}$ M; o una mayor afinidad. En una realización de la invención, la K_D es como se mide en un ensayo KinExA o ensayo de exclusión cinética similar. Véase, p. ej., Darling *et al.* Assay and Drug Dev. Tech. 2(6): 647-657 (2004).

65 **Métodos para producir anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos**

Las células de hibridoma que producen anticuerpos anti-LAG3 monoclonales precursores (p. ej., de ratón) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos analizados en el presente documento pueden producirse mediante métodos que son comúnmente conocidos en la técnica. Dichos hibridomas aislados son parte de la presente invención. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler, *et al.*, (1975) (Nature 256:495-497), así como la técnica del trioma (Hering, *et al.*, (1988) Biomed. Biochim. Acta. 47:211-216 y Hagiwara, *et al.*, (1993) Hum. Antibod. Hybridomas 4:15), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor, *et al.*, (1983) Immunology Today 4:72 y Cote, *et al.*, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030), la técnica del hibridoma con el VEB (virus de Epstein Barr) (Cole, *et al.*, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96, 1985), y electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión selectiva de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Preferentemente, se aíslan esplenocitos de ratón y se fusionan con PEG o mediante electrofusión con una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. A continuación, los hibridomas resultantes pueden explorarse para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células sueltas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50 %. Las células pueden sembrarse en placas a aproximadamente 2×10^5 células/ml en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene suero de clon fetal al 20 %, medios acondicionados "653" al 18 %, origen (IGEN) al 5 %, L-glutamina 4 mM, L-glutamina 1 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 50 unidades/ml, estreptomycin 50 mg/ml, gentamicina 50 mg/ml y HAT 1X (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que el HAT está reemplazado por HT. A continuación, los pocillos individuales pueden explorarse mediante ELISA para detectar anticuerpos de IgG monoclonales anti-LAG3. Una vez que se produce el crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden volver a sembrarse en placas, explorarse de nuevo y si siguen siendo positivos a la IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-LAG3, pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, para su caracterización, los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular.

Por tanto, la presente invención incluye métodos para producir un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende cultivar una célula de hibridoma que expresa el anticuerpo o fragmento en condiciones favorables para dicha expresión y, opcionalmente, aislar el anticuerpo o fragmento del hibridoma.

Los anticuerpos anti-LAG3 divulgados en el presente documento también pueden producirse de manera recombinante (p. ej., en un sistema de expresión *E. coli*/T7). En esta realización, los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de inmunoglobulina del anticuerpo anti-LAG3 de la invención pueden insertarse en un plásmido basado en pET y expresarse en el sistema *E. coli*/T7. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos para expresar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una cadena de inmunoglobulina del mismo en una célula hospedadora (p. ej. célula hospedadora bacteriana tal como *E. coli* tal como BL21 o BL21DE3) que comprende la expresión de la ARN polimerasa de T7 en la célula que también incluye un polinucleótido que codifica una cadena de inmunoglobulina que está unida operativamente a un promotor de T7. Por ejemplo, en una realización de la invención, una célula hospedadora bacteriana, tal como una *E. coli*, incluye un polinucleótido que codifica el gen de la ARN polimerasa de T7 unido operativamente a un promotor *lac* y la expresión de la polimerasa y la cadena se inducen mediante la incubación de la célula hospedadora con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido).

Existen varios métodos conocidos en la materia para producir anticuerpos recombinantes. En la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 se divulga un ejemplo de un método de producción recombinante de anticuerpos.

La transformación puede ser mediante cualquier método conocido de introducción de polinucleótidos en una célula hospedadora. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido o de los polinucleótidos en liposomas, inyección biolística y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero mediante vectores víricos. Los métodos de transformación de células son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 y 4.959.455.

Por tanto, la presente invención incluye métodos recombinantes para producir un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o una cadena de inmunoglobulina del mismo, que comprende (i) introducir un polinucleótido que codifica una o más cadenas de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, en donde el polinucleótido está en un vector y/o está unido operativamente a un promotor; (ii) cultivar la célula hospedadora (p. ej., CHO o *Pichia* o *Pichia pastoris*) en condiciones favorables para la expresión del polinucleótido y, (iii) opcionalmente, aislar el anticuerpo o fragmento o cadena de la célula hospedadora y/o medio en el que se cultiva la célula hospedadora. Al producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende más de una cadena de inmunoglobulina, p. ej., un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, la expresión conjunta de las cadenas en una sola célula hospedadora conduce a la

asociación de las cadenas, p. ej., en la célula o en la superficie celular o fuera de la célula si se secretan dichas cadenas, para formar el anticuerpo o la molécula del fragmento de unión a antígeno. Los métodos incluyen aquellos en los que solamente se expresa una cadena pesada de inmunoglobulina o solamente una cadena ligera de inmunoglobulina (p. ej., cualquiera de las analizados en el presente documento, incluidos fragmentos y/o dominios variables maduros de los mismos). Dichas cadenas son útiles, por ejemplo, como intermediarios en la expresión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que incluye dicha cadena. Por ejemplo, en el presente documento se divulgan anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina (o un dominio variable de la misma o que comprende las CDR de la misma) codificada por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 115 (o que codifica un dominio de la misma) y una cadena ligera de inmunoglobulina (o dominio variable de la misma o que comprende las CDR de la misma) codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en el SEQ ID NO: 125 (o que codifica un dominio variable de la misma) que son el producto de dichos métodos de producción, y, opcionalmente, los métodos de purificación expuestos en el presente documento.

Los anticuerpos anti-LAG3 también pueden sintetizarse mediante cualquiera de los métodos expuestos en la patente de Estados Unidos N.º 6.331.415.

Las células hospedadoras eucariotas y procariotas, incluyendo células de mamífero como hospedadoras para la expresión de los anticuerpos o fragmentos o cadenas de inmunoglobulina anti-LAG3 divulgados en el presente documento son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés). Estas incluyen, inter alia, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células A549, células 3T3, células HEK-293 y diversas líneas celulares distintas. Las células hospedadoras de mamífero incluyen células humanas, de ratón, de rata, de perro, de mono, de cerdo, de cabra, bovinas, de caballo y de hámster. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insectos (p. ej., *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células de anfibios, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Las células fúngicas incluyen células de levaduras y de hongos filamentosos que incluyen, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (Ogataea minuta), *Pichia lindneri*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* y *Neurospora crassa*. *Pichia* sp., cualquier *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, cualquier *Kluyveromyces* sp., *Candida albicans*, cualquier *Aspergillus* sp., *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, cualquier *Fusarium* sp., *Yarrowia lipolytica*, y *Neurospora crassa*.

Asimismo, la expresión de los anticuerpos y de los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y de las cadenas de inmunoglobulina de la invención (u otros restos de los mismos) a partir de líneas de células de producción se puede potenciar usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es una estrategia habitual para potenciar la expresión en determinadas condiciones. El sistema GS se analiza, total o parcialmente, en relación con las patentes europeas N.º 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y con la solicitud de patente europea N.º 89303964.4. Por tanto, en una realización de la invención, las células hospedadora de mamíferos (p. ej., CHO) carecen de un gen de glutamina sintetasa y se cultivan en ausencia de glutamina en el medio en donde, sin embargo, el polinucleótido que codifica la cadena de inmunoglobulina comprende un gen de glutamina sintetasa que complementa la falta del gen en la célula hospedadora.

La presente invención incluye métodos para purificar un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende introducir una muestra (p. ej., medio de cultivo, lisado celular o fracción de lisado celular, p. ej., una fracción soluble del lisado) que comprende el anticuerpo o fragmento a un medio de purificación (p. ej., medio de intercambio catiónico, medio de intercambio aniónico, medio de intercambio hidrófobo, medio de purificación por afinidad (p. ej., proteína A, proteína-G, proteína-A/G, proteína-L)) y recoger el anticuerpo purificado o el fragmento de la fracción de flujo continuo de dicha muestra que no se une al medio; o, descartar la fracción de flujo continuo y eluir el anticuerpo o fragmento unido del medio y recoger el eluato. En una realización de la invención, el medio está en una columna a la que se aplica la muestra. En una realización de la invención, el método de purificación se realiza tras la expresión recombinante del anticuerpo o fragmento en una célula hospedadora, p. ej., en donde la célula hospedadora se lisa primero y, opcionalmente, el lisado se purifica de materiales insolubles antes de la purificación en un medio; o en donde el anticuerpo o fragmento se secreta en el medio de cultivo por la célula hospedadora y el medio o una fracción del mismo se aplica al medio de purificación.

En general, las glucoproteínas producidas en una línea celular o animal transgénico particular tendrán un patrón de glucosilación que es característico de las glucoproteínas producidas en la línea celular o animal transgénico. Por lo tanto, el patrón de glucosilación particular de un anticuerpo dependerá de la línea celular o animal transgénico particular usado para producir el anticuerpo. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas del ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, o que comprenden las

secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento, comprenden la presente invención, independiente del patrón de glucosilación que puedan tener los anticuerpos. De forma similar, en realizaciones particulares, pueden ser ventajosos anticuerpos con un patrón de glucosilación que comprenden solamente *N*-glicanos no fucosilados, debido a que se ha demostrado que estos anticuerpos muestran normalmente una eficacia más potente que sus homólogos fucosilados tanto *in vitro* como *in vivo* [Véase, p. ej., Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); las Patentes de Estados Unidos N.º 6.946.292 y 7.214.775]. Es poco probable que estos anticuerpos con *N*-glicanos no fucosilados sean inmunogénicos porque sus estructuras de carbohidratos son un componente normal de la población que existe en la IgG sérica humana.

La presente invención incluye anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención que comprenden *N*-glicanos unidos que se añaden normalmente a inmunoglobulinas producidas en células de ovario de hámster chino (*N*-glicanos unidos a CHO) o a células de levadura modificadas por ingeniería (*N*-glicanos unidos a levaduras modificadas por ingeniería), tales como, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Por ejemplo, en una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende uno o más de los "*N*-glicanos unidos a levaduras modificadas por ingeniería" o "*N*-glicanos unidos a CHO" que se exponen en la Figura 6 (p. ej., G0 y/o G0-F y/o G1 y/o G1-F y/o y/o G2-F y/o Man5). En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende los *N*-glicanos unidos a levaduras modificadas por ingeniería, es decir, G0 y/o G1 y/o G2, opcionalmente, incluyendo adicionalmente Man5. En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende los *N*-glicanos unidos a CHO, es decir, G0-F, G1-F y G2-F, opcionalmente, incluyendo adicionalmente G0 y/o G1 y/o G2 y/o Man5. En una realización de la invención, aproximadamente del 80 % a aproximadamente el 95 % (p. ej., aproximadamente 80-90 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 %) de todos los *N*-glicanos unidos en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o cadenas de inmunoglobulina son *N*-glicanos unidos a levaduras modificadas por ingeniería o *N*-glicanos unidos a CHO. Véanse Nett *et al.* Yeast. 28(3): 237-252 (2011); Hamilton *et al.* Science. 313(5792): 1441-1443 (2006); Hamilton *et al.* Curr Opin Biotechnol. 18(5): 387-392 (2007). Por ejemplo, en una realización de la invención, una célula de levadura modificada por ingeniería es GF15.0 o YGLY8316 o las cepas expuestas en la patente de Estados Unidos N.º 7.795.002 o Zha *et al.* Métodos Mol Biol. 988:31-43 (2013). Véase también, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2013/066765.

La presente invención incluye anticuerpos policlonales anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, p. ej., una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos y fragmentos anti-LAG3, que incluye uno o más de los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención y el uso de los mismos. Un anticuerpo policlonal es un anticuerpo que se produce entre o en presencia de uno o más, anticuerpos distintos, no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de colecciones de linfocitos B diferentes, p. ej., el linfocito B de un animal tratado con un inmunógeno de interés, que produce una población de anticuerpos diferentes pero que están todos dirigidos al inmunógeno. Habitualmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado, p. ej., del bazo, suero o líquido ascítico.

La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 "antagonistas" y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y métodos de uso de los mismos, p. ej., anticuerpos y fragmentos antagonistas anti-LAG3 humanizados. Un anticuerpo anti-LAG3 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo antagoniza una actividad de LAG3 (p. ej., LAG3 humana) tal como inhibiendo la unión de LAG3 a moléculas MHC de clase II; compitiendo con moléculas MHC de clase II por la unión de LAG3; o cuando una célula o sujeto entra en contacto con el anticuerpo o fragmento, se produce un fenotipo biológico asociado con el antagonismo de LAG3, como la estimulación de la producción de IL-2 de linfocitos T específicos de antígeno.

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno biespecíficos y bifuncionales que tienen una especificidad de unión para LAG3 y otro antígeno tal como, por ejemplo, PD-1 o PD-L1 y el uso de los mismos. En una realización de la invención, las cadenas anti-PDI comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 41 y 42 o de las SEQ ID NO: 43 y 44. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante varios métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véanse, p. ej., Songsivilai, *et al.*, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321, Kostelny, *et al.*, (1992) J Immunol. 148:1547-1553. Además, los anticuerpos biespecíficos pueden formarse como "diacuerpos" (Holliger, *et al.*, (1993) PNAS USA 90:6444-6448) o como "Janusins" (Traunecker, *et al.*, (1991) EMBO J. 10:3655-3659 y Traunecker, *et al.*, (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52).

La presente invención incluye además fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de los anticuerpos anti-LAG3 divulgados en el presente documento. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos F(ab)₂, que pueden producirse por escisión enzimática de una IgG mediante, por ejemplo, pepsina. Los fragmentos Fab pueden producirse por, por ejemplo, reducción de F(ab)₂ con ditiotretol o mercaptoetilamina. Un fragmento Fab es una cadena V_L-C_L unida a una cadena V_H-C_{H1} mediante un puente disulfuro. Un fragmento F(ab)₂ está constituido por dos fragmentos Fab que, a su vez, están unidos por dos puentes disulfuro. La porción Fab de una molécula F(ab)₂ incluye una porción de la región F_c entre la que se encuentran los puentes disulfuro. Un fragmento F_V es una región V_L o V_H.

Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de las secuencias de aminoácidos del

dominio constante de sus cadenas pesadas. Hay al menos cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), p. ej., IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. La invención comprende anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de cualquiera de estas clases o subclases de anticuerpos.

5 En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 comprende una región constante de cadena pesada, p. ej., una región constante humana, tal como la región constante de cadena pesada humana $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ o $\gamma 4$ o una variante de las mismas. En otra realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 comprende una región constante de cadena ligera, p. ej., una región constante de cadena ligera humana, tal como la
10 región de cadena ligera humana λ o κ o una variante de las mismas. A modo de ejemplo, y sin limitación, la región constante de la cadena pesada humana puede ser $\gamma 4$ y la región constante de la cadena ligera humana puede ser κ . En una realización alternativa, la región Fc del anticuerpo es $\gamma 4$ con una mutación Ser228Pro (Schuurman, J et al., Mol. Immunol. 38: 1-8, 2001).

15 En algunas realizaciones, se pueden unir dominios constantes diferentes a regiones V_L y V_H humanizadas procedentes de las CDR proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, si un uso particular previsto de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención requiriera la alteración de las funciones efectoras, podría usarse un dominio constante de cadena pesada distinto de la IgG1 humana, o podría utilizarse un híbrido IgG1/IgG4.

20 Aunque los anticuerpos IgG1 humanos proporcionan una semivida larga y funciones efectoras, tales como activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, dichas actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En tales casos, se puede usar un dominio constante de IgG4 humana, por ejemplo. La presente invención incluye anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden un dominio constante de IgG4, p. ej., anticuerpos y fragmentos anti-LAG3 antagonistas humanizados y el uso de los
25 mismos. En una realización, el dominio constante de IgG4 puede diferir del dominio constante de IgG4 humana natural (número de acceso de Swiss-Prot P01861.1) en una posición correspondiente a la posición 228 en el sistema UE y la posición 241 en el sistema KABAT, donde la Ser108 natural se reemplaza con Pro, para prevenir un posible enlace disulfuro entre cadenas entre Cys106 y Cys109 (correspondientes a las posiciones Cys 226 y Cys 229 en el sistema UE y las posiciones Cys 239 y Cys 242 en el sistema KABAT) que podría interferir con la formación adecuada del
30 enlace disulfuro intracadena. Véase Angal *et al.* (1993) Mol. Immunol. 30:105. En otros casos, puede usarse un dominio constante de IgG1 modificado que se ha modificado para aumentar la semivida o reducir la función efectora.

Modificación por ingeniería de anticuerpos

35 También se incluyen realizaciones en las que los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos modificados por ingeniería para incluir modificaciones en los restos de las regiones marco dentro de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal precursor (p. ej., de ratón), p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo o fragmento. Normalmente, tales modificaciones en las regiones marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento. Esto generalmente se logra reemplazando los restos que no
40 son CDR en los dominios variables (es decir, restos de las regiones marco) en un anticuerpo o fragmento precursor (p. ej., de roedor) con restos análogos del repertorio inmunitario de la especie en la que se va a usar el anticuerpo, p. ej., restos humanos en el caso de agentes terapéuticos humanos. Dicho un anticuerpo o fragmento se denomina anticuerpo o fragmento "humanizado". En algunos casos, es deseable aumentar la afinidad o alterar la especificidad de un anticuerpo modificado por ingeniería (p.ej. humanizado). Una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la
45 región marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo o fragmento que se ha sometido a mutación somática puede contener restos de la región marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo. Dichos restos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias marco del anticuerpo o fragmento con las secuencias de la línea germinal de la que procede el anticuerpo o fragmento. Otra estrategia es revertir al resto original precursor (p. ej., de roedor) en una o más posiciones del
50 anticuerpo modificado por ingeniería (p. ej., humanizado), p. ej., para restaurar la afinidad de unión que puede haberse perdido en el proceso de reemplazo de los restos de la región marco. (Véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos n.º 5.693.762, la patente de Estados Unidos n.º 5.585.089 y la patente de Estados Unidos n.º 5.530.101).

55 Por ejemplo, la tabla 2, a continuación, muestra las regiones en las que una posición de un aminoácido de la región marco (utilizando el sistema de numeración de Kabat) difiere de la línea germinal y cómo esta posición puede retromutarse a la línea germinal mediante las sustituciones indicadas:

Tabla 2. Retromutaciones ilustrativas		
Región	Posición del aminoácidos de la región marco (numeración de Kabat)	Ejemplos de retromutaciones
AbA V_H	25	H25S
AbA V_H	68	S68T
AbA V_H	82a	T82aT

60 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 ese 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 7125689.

En realizaciones particulares, para proporcionar una mayor estabilidad química del anticuerpo final, sería deseable cambiar determinados aminoácidos que contienen cadenas laterales expuestas por otro resto de aminoácido, como se indica a continuación. Dichos cambios en la región de unión a antígeno pueden alterar la unión al antígeno. La desamidación de la asparagina puede producirse en secuencias N-G o D-G y puede dar como resultado la creación de un resto de ácido isoaspártico que puede introducir un pliegue en la cadena polipeptídica y puede disminuir su estabilidad (efecto de ácido isoaspártico). En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación no contienen sitios de isomería de asparagina.

Por ejemplo, un resto de asparagina (Asn) se puede cambiar por Gln o Ala para reducir el potencial de formación de isoaspartato en cualquier secuencia Asn-Gly, particularmente dentro de una CDR. Puede producirse un problema similar en una secuencia de Asp-Gly. Reissner y Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60:1281. La formación de isoaspartato puede debilitar o anular completamente la unión de un anticuerpo a su antígeno diana. Véase, Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 en 734. En una realización, la asparagina se cambia a glutamina (Gln). También puede ser deseable alterar un aminoácido adyacente a un resto de asparagina (Asn) o glutamina (Gln) para reducir la probabilidad de desamidación, que se produce a mayor velocidad cuando los aminoácidos pequeños se encuentran adyacentes a la asparagina o glutamina. Véase, Bischoff y Kolbe (1994) J. Chromatog. 662:261. Además, cualquier resto de metionina (normalmente Met expuesta a disolvente) en las CDR puede cambiarse a Lys, Leu, Ala, o Phe u otros aminoácidos para reducir la posibilidad de que el azufre de metionina se oxide, lo que podría reducir la afinidad de unión a antígeno y también contribuir a la heterogeneidad molecular en la preparación final de anticuerpos. *Id.* En una realización de la invención, la metionina se cambia a alanina (Ala). Adicionalmente, para prevenir o minimizar posibles enlaces peptídicos Asn-Pro escindibles, puede ser deseable alterar cualquier combinación de Asn-Pro encontrada en una CDR a Gln-Pro, Ala-Pro o Asn-Ala. Los anticuerpos con dichas sustituciones se exploran posteriormente para garantizar que las sustituciones no disminuyan la afinidad o especificidad del anticuerpo por LAG3 u otra actividad biológica deseada a niveles inaceptables.

TABLA 3. Variantes de CDR estabilizadoras ilustrativas

Resto de CDR	Secuencia variante estabilizadora
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly o Asn-Ala (Q-G), (A-G) o (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly o Asp-Ala (E-G), (A-G) o (D-A)
Met (normalmente expuesta al disolvente) (M)	Lys, Leu, Ala, o Phe (K), (L), (A) o (F)
Asn (N)	Gln o Ala (Q) o (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro o Asn-Ala (Q-P), (A-P) o (N-A)

Las cadenas de inmunoglobulina expuestas anteriormente 4A10, 19E8, 11C9 y 22D2 contienen restos con doble subrayado. El alcance de la presente invención incluye anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, polipéptidos y polinucleótidos como se analiza en el presente documento, en los que uno o más de dichos restos están mutados a cualquier otro resto incluyendo, por ejemplo, los de las secuencias variantes estabilizadoras expuestas anteriormente en la tabla 3.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de ratón se pueden humanizar mediante varios métodos conocidos en la técnica (véanse, p. ej., los métodos de humanización expuestos en los documentos WO2005/047326 o US7846443). Por ejemplo, en una realización de la invención, los anticuerpos y fragmentos anti-LAG3 de ratón se humanizan mediante un método en donde se usa modelado molecular asistido por ordenador para identificar bucles de CDR en cadenas de inmunoglobulina no humanas. Esta identificación se realiza basándose en la estructura tridimensional de la cadena de inmunoglobulina y la posición de los bucles en la cadena.

Las regiones marco humanas (obtenidas de la base de datos IMGD), en las que se introducirán los bucles no humanos, se seleccionan basándose en las mejores coincidencias (por comparación de secuencias de aminoácidos) con la secuencia no humana tanto en las regiones marco como en las CDR. Respecto a la FR4 en el dominio V_H, las regiones VJ, para las líneas germinales humanas, se comparan con las correspondientes regiones VJ no humanas; y, con respecto a FR4 en el dominio V_L, las regiones J-kappa y J-Lambda, de las secuencias de la línea germinal humana, se comparan con las correspondientes regiones J-Kappa y J-Lambda no humanas.

La orientación tridimensional adecuada de las CDR, que es fundamental para mantener la unión al antígeno, depende, en parte, en la interconexión adecuada entre el V_H y V_L. Por tanto, los modelos moleculares se construyen y utilizan para identificar restos en la interfaz V_L - V_H así como para identificar restos que potencialmente pueden alterar las conformaciones de las CDR y, por tanto, la unión al antígeno. En caso necesario, pueden introducirse mutaciones en

la cadena de inmunoglobulina para lograr propiedades deseables, p. ej., la unión al antígeno.

Los filtros de capacidad de desarrollo se establecen mediante el uso de técnicas de modelado molecular. Los filtros de capacidad de desarrollo son criterios que se utilizan para filtrar características de la cadena final de inmunoglobulina para evitar efectos no deseados. Los modelos moleculares se utilizan además para identificar aminoácidos expuestos a disolventes que pueden provocar efectos no deseados, tales como la glicosilación, desamidación y oxidación. Estos efectos sobre el anticuerpo pueden provocar cambios en la conformación del anticuerpo y, por tanto, en su función. Dichos problemas pueden producirse, por ejemplo, durante la ampliación o durante un período prolongado de tiempo cuando se expone a entornos químicos/físicos extremos. De nuevo, si es necesario, se pueden introducir mutaciones en las cadenas para lograr las propiedades deseadas.

Los filtros de capacidad de desarrollo generalmente se introducen al principio de la etapa de diseño de las cadenas humanizadas para eliminar/minimizar estos problemas potenciales. Los anticuerpos humanizados se someten además a criterios de diseño, tales como buena expresabilidad y puntos isoeléctricos deseables.

Modificación por ingeniería de la región Fc de los anticuerpos

Los anticuerpos (p. ej., Anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención también pueden modificarse por ingeniería para incluir modificaciones dentro de la región Fc, generalmente, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o función efectora (p. ej., citotoxicidad celular dependiente de antígeno). Asimismo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención se pueden modificar químicamente (p. ej., se pueden fijar uno o más grupos químicos al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo o fragmento. 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 UE de Kabat. Cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención que tenga las modificaciones (p. ej., modificaciones de Fc) y/o alteraciones analizadas en el presente documento son parte de la presente invención.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención también incluyen anticuerpos y fragmentos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; documentos WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Dichas modificaciones se puede usar para potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunitario, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, eliminaciones e inserciones), glicosilación o desglicosilación, y adición de múltiples Fc. Los cambios en la Fc también pueden alterar la semivida de los anticuerpos en los anticuerpos terapéuticos, permitiendo una dosificación menos frecuente y, por lo tanto, una mayor comodidad y un menor uso de material. Véase Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 en 734-35.

En una realización, el anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 es un anticuerpo o fragmento 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 bisagra de la región constante de cadena pesada. Se ha informado que esta mutación elimina la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre cadenas pesadas en la región bisagra (Angal *et al. supra*; la posición 241 se basa en el sistema de numeración de Kabat).

En una realización de la invención, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que se aumenta o disminuye el número de restos de cisteína en la región bisagra. Esta estrategia se divulga con más detalle 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, por ejemplo, para 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 o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo o fragmento. Más específicamente, 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 o fragmento tiene una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada en relación con la unión a SpA de Fc-bisagra natural. Esta estrategia se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos n.º 6.165.745.

En otra realización, el anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos 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, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.869.046 y 6.121.022.

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3. Por ejemplo, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un resto de aminoácido diferente, de tal forma que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo precursor. 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 con más detalle en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.624.821 y 5.648.260.

En otro ejemplo, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 por un resto de aminoácido diferente, de tal forma que el anticuerpo anti-LAG3 tiene unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o suprimida. Esta estrategia se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos n.º 6.194.551.

En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de fijar el complemento. Esta estrategia se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para disminuir la capacidad del anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para disminuir la afinidad del anticuerpo o fragmento por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 00/42072. Asimismo, se han mapeado los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

En una realización de la invención, la región Fc se modifica para disminuir la capacidad del anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados como los anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 para mediar la función efectora y/o aumentar las propiedades antiinflamatorias modificando los restos 243 y 264. En una realización, la región Fc del anticuerpo o fragmento se modifica cambiando los restos en las posiciones 243 y 264 a alanina. En una realización, la región Fc se modifica para disminuir la capacidad del anticuerpo o fragmento para mediar en la función efectora y/o aumentar las propiedades antiinflamatorias modificando los restos 243, 264, 267 y 328.

En otra realización más, el anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 comprende un patrón de glicosilación en particular. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo o fragmento aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). El patrón de glicosilación de un anticuerpo o fragmento se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad o avidez del anticuerpo o fragmento por un antígeno LAG3. Dichas modificaciones se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más de los sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo o del fragmento. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más de los sitios de glicosilación de la región marco variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede incrementar la afinidad o avidez del anticuerpo o fragmento por el antígeno. Véase, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5.714.350 y 6.350.861.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención incluyen los producidos en células hospedadoras eucariotas inferiores, en particular células hospedadoras de hongos tal como levadura (p. ej., *Pichia pastoris*) y hongos filamentosos, que se han modificado genéticamente para producir glicoproteínas que tienen patrones de glicosilación similares a los de mamíferos o de seres humanos (véase, por ejemplo, Choi *et al.*, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5022-5027; Hamilton *et al.*, (2003) Science 301: 1244-1246; Hamilton *et al.*, (2006) Science 313: 1441-1443). Una ventaja particular de estas células hospedadoras modificadas genéticamente sobre las líneas celulares de mamíferos utilizadas actualmente es la capacidad de controlar el perfil de glicosilación de las glicoproteínas que se producen en las células, de modo que se pueden producir composiciones de glicoproteínas en donde predomina una estructura de N-glicano en particular (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos N.º 7.029.872 y Patente de Estados Unidos N.º 7.449.308). Estas células hospedadoras modificadas genéticamente se han utilizado para producir anticuerpos que tienen predominantemente estructuras de N-glicanos (véase por ejemplo, Li *et al.*, (2006) Nat. Biotechnol. 24: 210-215).

En realizaciones particulares, los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen además los producidos en células hospedadoras eucariotas inferiores y que comprenden N-glicanos híbridos y complejos fucosilados y no fucosilados, incluyendo especies bisectadas y multiantenarias, incluyendo, pero sin limitación, N-glicanos tales como GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂; Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂; NANA₍₁₋₄₎Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂.

- En realizaciones particulares, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención pueden comprender anticuerpos o fragmentos que tienen al menos un *N*-glicano híbrido seleccionado del grupo que consiste en $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$; 5 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$; y $\text{NANAGalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. En aspectos particulares, el *N*-glicano híbrido es la especie de *N*-glicano predominante en la composición. En aspectos adicionales, el *N*-glicano híbrido es una especie particular de *N*-glicano que comprende aproximadamente el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de *N*-glicanos híbridos en la composición.
- 10 En realizaciones particulares, los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento, comprenden anticuerpos o fragmentos que tienen al menos un *N*-glicano complejo seleccionado del grupo que consiste en $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; y 15 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. En aspectos particulares, el *N*-glicano complejo es la especie de *N*-glicano predominante en la composición. En aspectos adicionales, el *N*-glicano complejo es una especie particular de *N*-glicano que comprende aproximadamente el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de *N*-glicanos complejos en la composición.
- 20 En realizaciones particulares, el *N*-glicano del anticuerpo y del fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 está fucosilado. En general, la fucosa está en un enlace $\alpha 1,3$ con la GlcNAc en el extremo reductor del *N*-glicano, en un enlace $\alpha 1,6$ con la GlcNAc en el extremo reductor del *N*-glicano, en un enlace $\alpha 1,2$ con la Gal en el extremo no reductor del *N*-glicano, en un enlace $\alpha 1,3$ con la GlcNAc en el extremo no reductor del *N*-glicano, o en un enlace $\alpha 1,4$ con uan GlcNAc en el extremo no reductor del *N*-glicano.
- 25 Por lo tanto, en aspectos particulares de las composiciones de glicoproteínas anteriores, la glicoforma está en una fucosa con enlace $\alpha 1,3$ o con enlace $\alpha 1,6$ para producir una glicoforma seleccionada del grupo que consiste en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ y $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$; en una fucosa con enlace $\alpha 1,3$ o 30 enlace $\alpha 1,4$ para producir una glicoforma seleccionada del grupo que consiste en $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, and $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; o en una fucosa con enlace $\alpha 1,2$ para producir una glicoforma seleccionada del grupo que consiste en 35 $\text{Gal}(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, y $\text{NANA}_2\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.
- En aspectos adicionales, los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden *N*-glicanos con alto contenido en manosa, incluyendo, pero sin limitación, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, o *N*-glicanos que consisten en la estructura de *N*-glicanos con $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.
- 40 En aspectos adicionales de lo anterior, los *N*-glicanos complejos incluyen además especies bisecadas y multiantenarias fucosiladas y no fucosiladas.
- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 o Ab9) comprende un dominio Fc de inmunoglobulina que comprende glicanos que comprenden ácido siálico (p. ej., ácido *N*-acetilneuramínico), p. ej., ácido $\alpha 2,3$ -siálico terminal o ácido $\alpha 2,6$ -siálico terminal. En una realización de la invención, los glicanos en el Fc son el 5, 10, 20, 50, 90 % o más especies sialiladas.
- 50 En una realización de la invención, el Fc comprende las mutaciones en las posiciones 297, 264 y/o 243.
- Como se usa en el presente documento, las expresiones "*N*-glicano" y "glicoforma" se usan indistintamente y se refieren a un *N*-oligosacárido unido, por ejemplo, uno que está fijado por un enlace asparagina-*N*-acetilglucosamina a un resto de asparagina de un polipéptido. Las *N*-glicoproteínas unidas contienen un resto de *N*-acetilglucosamina 55 unido al nitrógeno de la amida de un resto de asparagina en la proteína. Los azúcares predominantes que se encuentran en las glicoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosa, *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (p. ej., ácido *N*-acetilneuramínico (*NANA*)). El procesamiento de los grupos de azúcar se produce junto con la traducción en el lumen del RE y continúa postraduccionalmente en el aparato de Golgi para *N*-glicoproteínas unidas.
- 60 Los *N*-glicanos tienen un núcleo de pentasacárido común de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man" se refiere a manosa; "Glc" se refiere a glucosa; y "Nac" se refiere a *N*-acetilo; GlcNAc se refiere a *N*-acetilglucosamina). Habitualmente, Las estructuras de *N*-glicanos se presentan con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha. El extremo reductor del *N*-glicano es el extremo que se fija al resto Asn que comprende el sitio de glicosilación en la proteína. Los 65 *N*-glicanos difieren con respecto al número de ramificaciones (antenas) que comprenden azúcares periféricos (p. ej., GlcNAc , galactosa, fucosa y ácido siálico) que se añaden a la $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man3") estructura del núcleo que

también se conoce como "núcleo de trimanosa", el "núcleo de pentasacárido" o el "núcleo de paucimanosa". Los *N*-glicanos se clasifican según sus constituyentes ramificados (p. ej., con alto contenido en manosa, complejo o híbrido). Un tipo de *N*-glicano "con alto contenido en manosa" tiene cinco o más restos de manosa. Un tipo de *N*-glicano "complejo" normalmente tiene al menos una GlcNAc fijada al brazo 1,3 manosa y al menos una GlcNAc fijada al brazo 1,6 manosa de un núcleo de "trimanosa". Los *N*-glicanos también pueden tener galactosa ("Gal") o restos de *N*-acetilgalactosamina ("GalNAc") que están opcionalmente modificados con ácido siálico o derivados (p. ej., "NANA" o "NeuAc", donde "Neu" se refiere a ácido neuramínico y "Ac" se refiere a acetilo). Los *N*-glicanos complejos también pueden tener sustituciones intracadena que comprenden GlcNAc "bisectantes" y fucosa de central ("Fuc"). Los *N*-glicanos complejos también pueden tener múltiples antenas en el "núcleo de trimanosa", con frecuencia denominados "glicanos antenarios múltiples". Un *N*-glicano "híbrido" tiene al menos una GlcNAc en el extremo del brazo 1,3 manosa del núcleo de trimanosa y cero o más manosas en el brazo 1,6 manosa del núcleo de trimanosa. Los diversos *N*-glicanos también se denominan "glicoformas".

Con respecto a *N*-glicanos complejos, los términos "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" y "A2" significan lo siguiente. "G-2" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; el término "G-1" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; el término "G0" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; el término "G1" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; el término "G2" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; el término "A1" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; y, el término "A2" se refiere a una estructura de *N*-glicano que se puede caracterizar como $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. A menos que se indique lo contrario, las expresiones "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" y "A2" se refieren a especies de *N*-glicanos que carecen de fucosa fijada al resto de GlcNAc en el extremo reductor del *N*-glicano. Cuando el término incluye una "F", la "F" indica que las especies de *N*-glicano contiene un resto de fucosa en el resto de GlcNAc en el extremo reductor del *N*-glicano. Por ejemplo, G0F, G1F, G2F, A1F y A2F indican que el *N*-glicano incluye además un resto de fucosa fijado al resto de GlcNAc en el extremo reductor del *N*-glicano. Los eucariotas inferiores, tal como las levaduras y los hongos filamentosos, normalmente no producen *N*-glicanos que producen fucosa.

Con respecto a *N*-glicanos multiantenarios, la expresión "*N*-glicano multiantenarior" se refiere a *N*-glicanos que además comprenden un resto de GlcNAc en el resto de manosa que comprende el extremo no reductor del brazo 1,6 o del brazo 1,3 del *N*-glicano o un resto de GlcNAc en cada uno de los restos de manosa que comprenden el extremo no reductor del brazo 1,6 y del brazo 1,3 del *N*-glicano. Por tanto, los *N*-glicanos multiantenarios se pueden caracterizar por las fórmulas $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ o $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. El término "1-4" se refiere a 1, 2, 3 o 4 restos.

Con respecto a *N*-glicanos bisectados, la expresión "*N*-glicano bisectado" se refiere a *N*-glicanos en los que un resto de GlcNAc está unido al resto de manosa en el extremo reductor del *N*-glicano. Un *N*-glicano bisectado se puede caracterizar por la fórmula $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ en donde cada resto de manosa está unido en su extremo no reductor a un resto de GlcNAc. Por el contrario, cuando un *N*-glicano multiantenarior se caracteriza como $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, la fórmula indica que dos restos de GlcNAc están unidos al resto de manosa en el extremo no reductor de uno de los dos brazos de los *N*-glicanos y un resto de GlcNAc está unido al resto de manosa en el extremo no reductor del otro brazo del *N*-glicano.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) pueden contener además uno o más sitios de glicosilación en la región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina. Dichos sitios de glicosilación pueden dar como resultado una mayor inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento o una alteración de pK del anticuerpo debido a la unión a antígeno alterada Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala y Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *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 ha sabido que la glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T.

Cada anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) tendrán un punto isoelectrico exclusivo (pI). Por ejemplo, algunos anticuerpos, tal como Ab6, tienen un pI de aproximadamente 6,3.

Cada anticuerpo (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) tendrá una temperatura de fusión característica, indicando una mayor temperatura de fusión una mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurthy R y Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). En general, la t_{m1} (la temperatura de desplegamiento inicial) puede ser mayor de 60 °C, mayor de 65 °C o mayor de 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo o fragmento se puede medir usando calorimetría de barrido diferencial (Chen *et al.* (2003)

Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52) o dicroismo circular (Murray *et al.* (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9).

En una realización, se seleccionan anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo o fragmento se puede medir usando electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) y MALDI-MS (Alexander AJ y Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

En una realización adicional, se seleccionan anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención que tienen efectos de agregación mínimos, lo cual puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria no deseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos y fragmentos son aceptables con agregación del 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, o del 5 % o menos. La agregación se puede medir mediante varias técnicas, incluyendo la columna de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) y la dispersión de luz.

Conjugados de anticuerpos

Los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) también se pueden conjugar con un resto químico. Dichos anticuerpos y fragmentos conjugados son parte de la presente invención. El resto químico puede ser, inter alia, un polímero, un radionúclido o un factor citotóxico. En realizaciones particulares, el resto químico es un polímero que aumenta la semivida del anticuerpo o fragmento en el cuerpo de un sujeto. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrófilos que incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG) (p. ej., PEG con un peso molecular de 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12kDa, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa), dextrano y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee, *et al.*, (1999) (Bioconj. Chem. 10:973-981) divulga anticuerpos monocatenarios conjugados con PEG. Wen, *et al.*, (2001) (Bioconj. Chem. 12:545-553) divulgan anticuerpos de conjugación con PEG que está unido con un quelante radiometálico (ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)).

Los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) también se pueden conjugar con marcadores tales como ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷CU, ²¹⁷Ci, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th y ⁴⁰K, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Tr y ⁵⁶Fe.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 divulgados en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) también pueden estar PEGilados, por ejemplo, para aumentar su semivida biológica (p. ej., en suero). Para PEGilar un anticuerpo o fragmento, el anticuerpo o fragmento, normalmente reacciona con una forma reactiva de polietilenglicol (PEG), tal como un éster o derivado aldehído reactivo de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG comienzan a fijarse al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En realizaciones particulares, 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). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende incluir cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi (C1-C10) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento a pegar es un anticuerpo o fragmento aglicosilado. Métodos para pegar proteínas son conocidos en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véanse, p. ej., los documentos EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 divulgados en el presente documento (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) también se pueden conjugar con marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes, incluyendo fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina, ¹⁵²Eu, dansilo, umbeliferona, luciferina, marcador luminal, marcador isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de aecuatorina, 2,3-dihidroftalacinadonas, biotina/avidina, marcadores de espín y radicales libres estables.

Los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden conjugarse con un factor citotóxico tal como la toxina diftérica, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina de *Pseudomonas aeruginosa*, proteínas y compuestos (p. ej., ácidos grasos) de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas PAPI, PAPII y PAP-S de *Phytolaca americana*, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9) a los diversos restos, incluyendo los métodos descritos por Hunter, *et al.*, (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.*, (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, *et al.*, (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; y Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Los métodos para conjugar anticuerpos y fragmentos son convencionales y muy bien conocidos en la técnica.

Usos terapéuticos de los anticuerpos anti-LAG3

Se proporcionan además los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer en sujetos, tal como sujetos humanos. En una realización de la invención, dicho sujeto padece y se trata de cáncer, p. ej., un tumor sólido que incluye, además de las células tumorales, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), tal como los linfocitos T, que expresa LAG3, p. ej., osteosarcoma, rabdomiosarcoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de células transicionales renales, cáncer de vejiga, cáncer de Wilm, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama (p. ej., caracterizado por una mutación en *BRCA1* y/o *BRCA2*), cáncer de prostata, cáncer óseo, cáncer de pulmón (p. ej. cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, sarcoma sinovial, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, mieloma múltiple, cáncer de células renales, retinoblastoma, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, melanoma, tumor rabdoide de riñón, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, cáncer de cerebro, glioblastoma, meningioma, adenoma hipofisario, schwannoma vestibular, un tumor neuroectodérmico primitivo, meduloblastoma, astrocitoma, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma, ependimoma, papiloma del plexo coroideo, policitemia vera, trombocitemia, mielofibrosis idiopática, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, cáncer carcinoide o cáncer de hígado, cáncer de mama o cáncer de estómago. En una realización de la invención, el cáncer es cáncer metastásico, p. ej., de las variedades descritas anteriormente.

La presente invención también proporciona los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto. En una realización de la invención, la enfermedad infecciosa es infección vírica. En una realización de la invención, la enfermedad infecciosa es infección bacteriana. En una realización de la invención, la enfermedad infecciosa es una infección parasitaria. En una realización de la invención, la enfermedad infecciosa es una infección fúngica.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento de cualquiera de los cánceres o enfermedades infecciosas analizados en el presente documento mediante la administración del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno opcionalmente en asociación con cualquiera de los agentes quimioterapéuticos o procedimientos terapéuticos analizados en el presente documento así como composiciones que incluyen dicho anticuerpo o fragmento en asociación con dicho agente quimioterapéutico adicional.

En una realización de la invención, la infección vírica es la infección por un virus seleccionado del grupo que consiste en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del Ébola, virus de la hepatitis (A, B o C), virus del herpes (p. ej., VVZ, HSV-I, HAV-6, HSV-II, y CMV, virus de 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 o virus de la encefalitis arboviral.

En una realización de la invención, la infección bacteriana es la infección por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Chlamydia*, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos y gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, *Legionella*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella*, bacilos, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetan*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, y *Borrelia*.

En una realización de la invención, la infección por hongos es la infección por un hongo seleccionado del grupo que consiste en *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), géneros *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

En una realización de la invención, la infección parasitaria es la infección por un parásito seleccionado del grupo que consiste en *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

También se divulga en el presente documento un método para prevenir o inhibir la unión de LAG3 a MHC de clase II, potenciar la activación de linfocitos T específicos de antígeno o estimular la producción por linfocitos T de interleucina-2 en un sujeto (p. ej., un ser humano), por ejemplo, en donde el sujeto padece cáncer o enfermedad infecciosa (p. ej., como se analiza en el presente documento) que comprende administrar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9, 22D2, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8

y/o Ab9, al sujeto, opcionalmente, en asociación con un agente quimioterapéutico adicional, p. ej., pembrolizumab o nivolumab.

5 También se divulgan en el presente documento los usos de los anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto.

10 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de osteosarcoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

15 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de rabdomiosarcoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

20 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de neuroblastoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

25 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de riñón, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

30 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de leucemia, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

35 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de células transicionales renales, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

40 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de vejiga, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

45 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de Wilm, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

50 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de ovario, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

55 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de páncreas, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

60 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de mama, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. En una realización de la invención, el método para el tratamiento o prevención del cáncer de mama comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en asociación con una antraciclina (p. ej., doxorubicina y/o epirubicina) y/o un taxano (p. ej., paclitaxel y/o docetaxel). Opcionalmente, una antraciclina y taxano está en asociación con 5-fluorouracilo (5-FU), ciclofosfamida y carboplatino.

65 En una realización de la invención, en donde el cáncer de mama es HER2 positivo, el anticuerpo o fragmento anti-LAG3 se administra en asociación con trastuzumab, opcionalmente con un taxano y/o pertuzumab.

- 5 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de próstata, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 10 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer óseo, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 15 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de pulmón, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. En una realización de la invención, el método de tratamiento o prevención de cáncer de pulmón comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en asociación con bevacizumab y/o cetuximab.
- 20 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de pulmón no microcítico, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. En una realización de la invención, el método de tratamiento o prevención de cáncer de pulmón no microcítico comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en asociación con cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel unido a albúmina, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecán, etopósido, vinblastina y/o pemetrexed.
- 25 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de estómago, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 30 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer colorrectal, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. En una realización de la invención, el método de tratamiento o prevención de cáncer colorrectal comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en asociación con 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, irinotecán y/o oxaliplatino (p. ej., FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI o CapeOx).
- 35 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de cuello uterino, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 40 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de sarcoma sinovial, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 45 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de cabeza y cuello, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 50 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 55 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de mieloma múltiple, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.
- 60 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de células renales, que comprende administrar
- 65

(opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

5 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de retinoblastoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

10 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de hepatoblastoma, que comprende administrar (opcionalmente en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

15 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de carcinoma hepatocelular, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

20 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de melanoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

25 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de tumor rabdoide del riñón, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

30 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de sarcoma de Ewing, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

35 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de condrosarcoma, que comprende administrar (opcionalmente en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

40 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de cerebro, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

45 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de glioblastoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. En una realización de la invención, el método de tratamiento o prevención de glioblastoma multiforme comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en asociación con temozolomida.

50 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de meningioma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

55 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de adenoma hipofisario, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

60 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de schwannoma vestibular, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

65 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención

para su uso en métodos de tratamiento o prevención de un tumor neuroectodérmico primitivo, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

5 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de meduloblastoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

10 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de astrocitoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

15 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de astrocitoma anaplásico, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. En una realización de la invención, el método de tratamiento o prevención de astrocitoma anaplásico refractario comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo
20 de la presente invención en asociación con temozolomida.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de oligodendroglioma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un
25 sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de ependimoma, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un
30 ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de papiloma del plexo coroideo, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un
35 sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de policitemia vera, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como
40 un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de trombocitemia, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como
45 un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de mielofibrosis idiopática, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un
50 sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de sarcoma de tejido blando, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un
55 sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de tiroides, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un
60 sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de endometrio, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un
65 sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer carcinoide, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de hígado, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de mama (p. ej., caracterizado por una mutación en *BRCA1* y/o *BRCA2*), que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer de estómago, que comprende administrar (opcionalmente, en asociación con pembrolizumab o nivolumab) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en un sujeto que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico tal como un inhibidor de proteasas, un nucleósido/nucleótido inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa, un inhibidor de entrada, un inhibidor de la fusión o un inhibidor de la integrasa.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus Bundibugyo (BDBV, por sus siglas en inglés), virus de Sudán (SUDV, por sus siglas en inglés), virus de Tai Forest (TAFV, por sus siglas en inglés) y/o virus del ébola, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico, tal como uno o más anticuerpos que se unen específicamente al BDBV, SUDV, TAFV o virus del ébola o un nucleósido inhibidor de la ARN polimerasa; o una vacuna.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la hepatitis A, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la hepatitis B, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la hepatitis C, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico tal como interferón y/o ribavirina.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus del herpes, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la estomatitis vesicular, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus del herpes simple I, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención

para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus HAV-6, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

- [illegible]

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

5 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus del sarampión, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

10 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la rubéola, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

15 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por parvovirus, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

20 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus vaccinia, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

25 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV, por sus siglas en inglés), que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

30 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus del dengue, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

35 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por papilomavirus, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

40 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus del molusco, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

45 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por poliovirus, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

50 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la rabia, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

55 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus John Cunningham (virus JC), que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

60 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por el virus de la encefalitis por arbovirus, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antivírico.

65 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Chlamydia trachomatis*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Cryptococcus neoformans*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

5

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Aspergillus fumigatus*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

10

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Aspergillus niger*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

15

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Mucorales mucor*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

20

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Mucorales absidia*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

25

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Mucorales rhizopus*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

30

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Sporothrix schenckii*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

35

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Blastomyces dermatitidis*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

40

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Paracoccidioides brasiliensis*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

45

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Coccidioides immitis*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

50

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Histoplasma capsulatum*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano. Opcionalmente, al sujeto se le administra un agente terapéutico antifúngico.

55

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Entamoeba histolytica*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

60

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Balantidium coli*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

65

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Naegleria fowleri*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Acanthamoeba* sp., que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

5 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Giardia lamblia*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

10 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Cryptosporidium* sp., que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

15 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Pneumocystis carinii*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

20 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Plasmodium vivax*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

25 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Babesia microti*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Trypanosoma brucei*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

30 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Trypanosoma cruzi*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

35 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Leishmania donovani*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

40 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Toxoplasma gondii*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

45 La presente invención incluye los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección por *Nippostrongylus brasiliensis*, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, tal como un ser humano.

Un "sujeto" es un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, ratón, rata, mono (p. ej., mono cynomolgus, p. ej., *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*) o conejo.

50 En realizaciones particulares, los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden usarse solos o en asociación con otros, agentes terapéuticos y/o procedimientos terapéuticos adicionales, para el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad tal como cáncer, p. ej., tal como se analiza en el presente documento, en un sujeto que necesite dicho tratamiento o prevención. Las composiciones o kits, p. ej., las composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprenden dichos anticuerpos y fragmentos en asociación con agentes terapéuticos adicionales también forman parte de la presente invención.

55 En realizaciones particulares, los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención se pueden usar en asociación con un agente terapéutico contra el cáncer o un fármaco inmunomodulador tal como un inhibidor del receptor inmunomodulador, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al receptor.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con uno o más inhibidores (p. ej., una molécula orgánica pequeña o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) tal como: un inhibidor de MTOR (diana de rapamicina en mamíferos), un agente citotóxico, un agente de

platino, un inhibidor de BRAF, un inhibidor de CDK4/6, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de VEGF, un estabilizador de microtúbulos, un taxano, un inhibidor de CD20, un inhibidor de CD52, un inhibidor de CD30, un inhibidor de RANK (receptor activador del factor kappa-B nuclear), un inhibidor de RANKL (receptor activador del ligando del factor kappa-B nuclear), un inhibidor de ERK, un inhibidor de MAP cinasa, un inhibidor de AKT, un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K, un inhibidor de HER1, un inhibidor de HER2, un inhibidor de HER3, un inhibidor de HER4, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de CD22, un inhibidor de CD79b, un inhibidor de ErbB2 o un inhibidor de la proteína farnesil transferasa.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con uno o más de: anti-PDL (p. ej., pembrolizumab, nivolumab, CT-011), anti-PDLI, anti-CTLA4, anti-TIM3, anti-CSI, (p. ej., elotuzumab), anti-KIR2DL1/2/3 (p. ej., lirilumab), anti-CD27, anti-CD137 (p. ej., urelumab), anti-GITR (p. ej., TRX518), anti-PD-LI (p. ej., BMS-936559, MSB0010718C o MPDL3280A), anti-PD-L2, anti-ILT1, anti-ILT2, anti-ILT3, anti-ILT4, anti-ILT5, anti-ILT6, anti-ILT7, anti-ILT8, anti-CD40, anti-OX40, anti-CD137, anti-KIR2DL1, anti-KIR2DL2/3, anti-KIR2DL4, anti-KIR2DL5A, anti-KIR2DL5B, anti-KIR3DL1, anti-KIR3DL2, anti-KIR3DL3, anti-NKG2A, anti-NKG2C, anti-NKG2E, o cualquier inhibidor de moléculas orgánicas pequeñas de dichas dianas; IL-10, anti-IL10, anti-TSLP (linfopoyetina del estroma tímico) o IL-10 PEGilada.

En una realización de la invención, el peso molecular del resto de polietilenglicol (PEG), en una molécula de IL-10 PEGilada, es de aproximadamente 12.000 daltons o aproximadamente 20.000 daltons. En una realización de la invención, la IL-10 PEGilada (p. ej., IL-10 humana PEGilada) comprende una o más moléculas de polietilenglicol fijadas covalentemente mediante un enlazador (p. ej., C_{2-12} alquilo tal como $-CH_2CH_2CH_2-$) a un solo resto de aminoácido de una sola subunidad de IL-10, en donde dicho resto de aminoácido es el grupo alfa amino del resto de aminoácido aminoterminal o el grupo amino épsilon de un resto de lisina. En una realización de la invención, la IL-10 PEGilada es: $(PEG)_b-L-NH-IL-10$; en donde b es 1-9 y L es un resto enlazador alquilo C_{2-12} fijado covalentemente a un nitrógeno (N) del resto de aminoácido único de la IL-10. En una realización de la invención, la IL-10 de la IL-10 PEGilada tiene la fórmula: $[X-O(CH_2CH_2O)_n]_b-L-NH-IL-10$, en donde X es H o alquilo C_{1-4} ; n es de 20 a 2300; b es de 1 a 9; y L es un rsto enlazador alquilo C_{1-11} que está fijado covalentemente al nitrógeno (N) del grupo alfa amino en el extremo amino terminal de una subunidad de IL-10; siempre que cuando b sea mayor que 1, el total de n no excede de 2300. Véase el documento US7.052686.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-10 o fragmento de unión a antígeno del mismos (p. ej., anticuerpo humanizado) comprende las CDR expuestas a continuación:

CDR-L1: KTSQNIFENLA (SEQ ID NO: 465)
 CDR-L2: NASPLQA (SEQ ID NO: 466)
 CDR-L3: HQYYSGYT (SEQ ID NO: 467)
 CDR-H1: GFTFSDYHMA (SEQ ID NO: 468)
 CDR-H2: SITLDATYTYRDSVRG (SEQ ID NO: 469)
 CDR-H3: HRGFSVWLDY (SEQ ID NO: 470)
 (Véase el documento US7.662.379)

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-TSLP o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado) comprende las CDR expuestas a continuación:

CDR-H1: GYIFTDYAMH (SEQ ID NO: 428);
 CDR-H2: TFIPLDTSYDYNQNFK (SEQ ID NO: 429);
 CDR-H3: MGVTHSYVMDA (SEQ ID NO: 430);
 CDR-L1: RASQPISISVH (SEQ ID NO: 431);
 CDR-L2: FASQSIG (SEQ ID NO: 432);
 CDR-L3: QQTFSLPYT (SEQ ID NO: 433);
 (véase el documento WO2008/76321)

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-CD27 o fragmento de unión a antígeno del mismos (p. ej., anticuerpo humanizado) comprende las CDR expuestas a continuación:

CDR-H1: GFIIKATYMH (SEQ ID NO: 420);
 CDR-H2: RIDPANGETKYDPKFQV (SEQ ID NO: 421);
 CDR-H3: YAWYFDV (SEQ ID NO: 422);
 CDR-L1: RASENIYSFLA (SEQ ID NO: 423);
 CDR-L2: HAKTLAE (SEQ ID NO: 424);
 CDR-L3: QHYYSPLT (SEQ ID NO: 425);
 (Véase el documento WO2012/04367).

Por tanto, la presente invención incluye composiciones que comprenden un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en asociación con pembrolizumab; así como el anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno para su uso en métodos de tratamiento o prevención de cáncer, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo en asociación con pembrolizumab (p. ej., pembrolizumab dosificado a 200 mg una vez cada tres semanas) al sujeto. Opcionalmente, al sujeto también se le administra en asociación con otro agente terapéutico adicional.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con un anticuerpo de pembrolizumab que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina (o CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la misma) que comprende la secuencia de aminoácidos:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFKNEKFKNRVLTLTDSSTTTAY
MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 41);

y una cadena ligera de inmunoglobulina (o CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la misma) que comprende la secuencia de aminoácidos:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQKPKGQAPRLLIYLAASYLESQVPAFSGSGSDFTLTIS
SLEPEDFAVYYCQHSRDLPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 42).

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina (o CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la misma) que comprende la secuencia de aminoácidos:

QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLF
LQMNSLRADTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 43);

y una cadena ligera de inmunoglobulina (o CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la misma) que comprende la secuencia de aminoácidos:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAITGIPARFSGSGSDFTLTISSELEP
EDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 44).

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con uno cualquiera o más de: ácido 13-cis-retinoico, 3-[5-(metilsulfonilpiperadinmetil)-indolil]-quinolona, 4-hidroxitamoxifeno, 5-desoxiuridina, 5'-desoxi-5-fluorouridina, 5-fluorouracilo, 6-mecaptopurina, 7-hidroxiataurosporina, A-443654, acetato de abiraterona, abraxano, ABT-578, acolbifeno, ADS-100380, aflibercept, ALT-110, altretamina, amifostina, aminoglutetimida, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, angiostatina, AP-23573, ARQ-197, arzoxifeno, AS-252424, AS-605240, asparaginasa, ATI3387, AT-9263, atrasentán, axitinib, AZD1152, vacuna de *Bacillo de Calmette-Guerin* (BCG), batabulina, BC-210, besodutox, bevacizumab, BGJ398, bicalutamida, Bio111, BIO140, BKM120, bleomicina, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, bortezomib, buserelina, busulfán, calcitriol, camptotecina, canertinib, capecitabina, carboplatino, carmustina, CC8490, CEA (vacuna recombinante vaccinia-antígeno carcinoembrionario), cediranib, CG-1521, CG-781, clamidocina, clorambucilo, clorotoxina, cilengitida, cimitidina, cisplatino, cladribina, clodronato, cobimetnib, COL-3, CP-724714, ciclofosfamida, ciproterona, acetato de ciproterona, citarabina, arabinósido de citosina, dabrafenib, dacarbazina, dacinostat, dactinomicina, dalotuzumab, danusertib, dasatanib, daunorrubicina, decatanib, deguelin, denileucina,

- desoxicoformicina, depsipéptido, diarilpropionitrilo, dietilestilbestrol, diftotox, DNE03, docetaxel, dovitinib, doxorubicina, droloxifeno, edotecarina, edotreótido marcado con itrio-90, edotreotida, EKB-569, EMD121974, encorafenib, endostatina, enzalutamida, enzastaurina, epirubicina, epitilona B, ERA-923, erbitux, erlotinib, estradiol, estramustina, etopósido, everolimus, exemestano, ficlatuzumab, finasterida, flavopiridol, floxuridina, fludarabina, 5 fludrocortisona, fluoximasterona, flutamida, régimen FOLFOX, fulvestrant, galeterona, ganetespib, gefitinib, gemcitabina, gimatecán, glucopiranosil lípido A, goserelina, acetato de goserelina, gosipol, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, caproato de hidroxiprogesterona, hidroxiurea, IC87114, idarrubicina, idoxifeno, ifosfamida, IM862, imatinib, IMC-1C11, imiquimod, INC280, INCB24360, INO1001, interferón, interleucina -2, interleucina-12, ipilimumab, irinotecán, JNJ-16241199, ketoconazol, KRX-0402, lapatinib, lasofoxifeno, LEE011, letrozol, leucovorina, leuprolida, 10 acetato de leuprolida, levamisol, paclitaxel atrapado en liposomas, lomustina, lonafarnib, lucantona, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, LY3009120, marimastat, mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, MEK162, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, una suspensión de *Mycobacterium obuenses* desactivado por calor, tozasertib, MLN8054, natitoclax, neovastat, neratinib, neuradiab, nilotinib, nilutimida, nolatrexed, NVP-BEZ235, oblimersen, 15 octreotida, ofatumumab, oregovomab, ornatuzumab, orteronel, oxaliplatino, paclitaxel, palbociclib, pamidronato, panitumumab, pazopanib, PD0325901, PD184352, PEG-interferón, pemetrexed, pentostatina, perifosina, mostaza de fenilalanina, PI-103, pictilisib, PIK-75, pipendoxifeno, PKI-166, plicamicina, poli-ICLC, porfímero, prednisona, procarbazona, progestinas, polisacárido unido a proteína PSK (procedente de *Basidiomycetes coriolus versicolor*), PLX8394, PX-866, R-763, raloxifeno, raltitrexed, razoxina, ridaforolimus, rituximab, romidepsina, RTA744, rubitecán, 20 scriptaid, Sdx102, seliciclib, selumetinib, semaxanib, SF1126, sirolimus, SN36093, sorafenib, espironolactona, escualamina, SR13668, estreptozocina, SU6668, ácido hidroxámico suberoilanolida, sunitinib, estrógeno sintético, talampanel, talimogén laherparepvec, tamoxifeno, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, tesmilifeno, testosterona, tetrandrina, TGX-221, talidomida, 6-tioguanina, tiotepa, ticilimumab, tipifarnib, tivozanib, TKI-258, TLK286, TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), topotecán, citrato de toremifeno, trabectedina, trametinib, trastuzumab, tretinoína, 25 tricostatina A, tricitiribfosfato monohidrato, pamoato de triptorelina, TSE-424, mostaza de uracilo, ácido valproico, valrubicina, vandetanib, vatalanib, trampa de VEGF, vemurafenib, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vitaxina, vitespán, vorinostat, VX-745, wortmanina, Xr311, extracto de *Bacilo tuberculosis* en agua caliente Z-100, zanolimumab, ZK186619, ZK-304709, ZM336372 o ZSTK474.
- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con uno o más antieméticos que incluyen, pero sin limitación: casopitant (GlaxoSmithKline), Netupitant (MGI-Helsinn) y otros antagonistas del receptor NK-1, palonosetrón (vendido como Aloxi por MGI Pharma), aprepitant (vendido como Emend por Merck and Co.; Rahway, NJ), difenhidramina (vendida como Benadryl® por Pfizer; Nueva York, NY), 35 hidroxizina (vendida como Atarax® por Pfizer; Nueva York, NY), metoclopramida (vendida como Reglan® por AH Robins Co; Richmond, VA), lorazepam (vendido como Ativan® por Wyeth; Madison, NJ), alprazolam (vendido como Xanax® por Pfizer; Nueva York, NY), haloperidol (vendido como Haldol® por Ortho-McNeil; Raritan, NJ), droperidol (Inapsine®), dronabinol (vendido como Marinol® por Solvay Pharmaceuticals, Inc.; Marietta, GA), dexametasona (vendida como Decadron® por Merck and Co.; Rahway, NJ), metilprednisolona (vendida como Medrol® por Pfizer; Nueva York, NY), proclorperazina (vendida como Compazine® por Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), 40 granisetron (vendido como Kytril® por Hoffmann-La Roche Inc.; Nutley, NJ), ondansetrón (vendido como Zofran® por Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), dolasetron (vendido como Anzemet® por Sanofi-Aventis; Nueva York, NY), tropisetron (vendido como Navoban® por Novartis; East Hanover, NJ).
- 45 Otros efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer incluyen la deficiencia de glóbulos rojos y blancos. En consecuencia, en una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con un agente que trata o previene dicha deficiencia, tales como, p. ej., filgrastim, PEG-filgrastim, 50 eritropoyetina, epoetina alfa o darbepoetina alfa.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con una vacuna. En una realización de la invención, la vacuna es una vacuna contra el cáncer, una vacuna peptídica o una vacuna de ADN. Por ejemplo, en una realización de la invención, la vacuna es una célula tumoral (p. ej., una 55 célula tumoral irradiada) o una célula dendrítica (p. ej., una célula dendrítica pulsada con un péptido tumoral).
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se administra en asociación con un procedimiento terapéutico. Un procedimiento terapéutico es una o más etapas llevadas a cabo por 60 un médico o facultativo en el tratamiento de un sujeto que está destinado a aliviar uno o más síntomas (p. ej., de cáncer y/o enfermedad infecciosa) en el sujeto tratado, ya sea induciendo la regresión o eliminación de dichos síntomas o inhibiendo la progresión de dichos síntomas, p. ej., síntomas de cáncer tal como crecimiento de tumores o metástasis, por cualquier grado clínicamente medible.
- 65 En una realización de la invención, un procedimiento terapéutico es la radioterapia contra el cáncer. Por ejemplo, en una realización de la invención, la radioterapia es la terapia de haz externo (EBT, por sus isgla en inglés): un método

- para suministrar un haz de rayos X de alta energía a la ubicación del tumor. El haz se genera fuera del paciente (p. ej., mediante un acelerador lineal) y se dirige al sitio del tumor. Estos rayos X pueden destruir las células cancerosas y la planificación cuidadosa del tratamiento permite preservar los tejidos normales circundantes. No se colocan fuentes radiactivas dentro del cuerpo del paciente. En una realización de la invención, la radioterapia es la terapia con haz de protones: un tipo de terapia conformada que bombardea el tejido enfermo con protones en lugar de rayos X. En una realización de la invención, la radioterapia es radioterapia conformada de haz externo: procedimiento que utiliza tecnología avanzada para adaptar la radioterapia a las estructuras corporales de una persona.
- En una realización de la invención, la radioterapia es braquiterapia: la colocación temporal de materiales radiactivos dentro del cuerpo, habitualmente se emplea para administrar una dosis extra (o refuerzo) de radiación en un área.
- En una realización de la invención, un procedimiento quirúrgico administrado en asociación con un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es la tumorectomía quirúrgica.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de MTOR (diana de rapamicina en mamíferos).
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un agente citotóxico.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un agente de platino.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de EGFR.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de VEGF.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un estabilizador de microtúbulos.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un taxano o un inhibidor de CD20.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de CD52.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de CD30.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de RANK (receptor activador del factor nuclear kappa-B).
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de RANKL (receptor activador del ligando del factor nuclear kappa-B).
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de BRAF, p. ej., para el tratamiento de melanoma.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) de la presente invención está en asociación con un inhibidor de CDK4/6, p. ej., para el tratamiento de melanoma.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-KIR3DL1.

- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-KIR3DL2.

- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-KIR3DL3.

- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-NKG2A.

- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-NKG2C.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-NKG2E.

- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con IL-10.

- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-IL10.

- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anti-TSLP (linfopoyetina del estroma tímico).

- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con IL-10 PEGilada. En una realización de la invención, La IL-10 PEGilada se administra al sujeto a una dosis de hasta 20 microgramos/kg (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 microgramos/kg). Por ejemplo, hasta 20 microgramos/kg al día, p. ej., hasta cuatro (p. ej., 1, 2, 3 o 4) ciclos de 28 días, p. ej., 20 microgramos/kg/día durante cuatro ciclos de 28 días.

- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con el ácido 13-cis-retinoico.

- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 3-[5-(metilsulfonilpiperadinmetil)indolil]-quinolona.

- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 4-hidroxitamoxifeno.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 5-desoxiuridina.

- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 5'-desoxi-5-fluorouridina.

- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 5-fluorouracilo.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 6-mercaptopurina.
- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 7-hidroxistauroporina.
- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con A-443654.
- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acetato de abiraterona.
- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con abraxano.
- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ABT-578.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acolbifeno.
- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ADS-100380.
- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ALT-110.
- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con altretamina.
- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con amifostina.
- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con amrubicina.
- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con amsacrina.
- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anagrelida.
- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con anastrozol.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un

anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con angiostatina.

5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con AP-23573.

10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ARQ-197.

15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con arzoxifeno.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con AS-252424.

20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con AS-605240.

25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con asparaginasa.

30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con AT-9263.

35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con atrasentán.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con axitinib.

40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con AZD1152.

45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vacuna de *Bacilo de Calmette-Guerin* (BCG).

50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con batabulina.

55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con BC-210.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con besodutox.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con bevacizumab.

65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con bicalutamida.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con Bio111.
- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con BIO140.
- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con bleomicina.
- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con BMS-214662.
- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con BMS-247550.
- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con BMS-275291.
- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con bortezomib.
- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con buserelina.
- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con busulfán.
- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con calcitriol.
- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con camptotecina.
- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con capecitabina.
- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con carboplatino.
- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con carmustina.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej.,

anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con CC8490.

5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con CEA (vacuna recombinante vaccinia-antígeno carcinoembrionario).

10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con cediranib.

15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con CG-1521.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con CG-781.

20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con clamidocina.

25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con clorambucilo.

30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con clorotoxina.

35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con cilengitida.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con cimitidina.

40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con cisplatino.

45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con cladribina.

50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con clodronato.

55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con COL-3.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con CP-724714.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ciclofosfamida.

65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ciproterona.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acetato de ciproterona.
- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con citarabina.
- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con arabinósido de citosina.
- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dacarbazina.
- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dacinostat.
- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dactinomicina.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dalotuzumab.
- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con danusertib.
- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dasatanib.
- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con daunorrubicina.
- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con decatanib.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con deguelin.
- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con denileucina.
- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con desoxicoformicina.
- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con depsipéptido.
- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con diarilpropionitrilo.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un

anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dietilestilbestrol.

5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con diftotox.

10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con docetaxel.

15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con dovitinib.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con doxorubicina.

20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con droloxifeno.

25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con edotecarina.

30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con edotreótido marcado con itrio-90.

35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con edotreótido.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con EKB-569.

40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con EMD121974.

45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con endostatina.

50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con enzalutamida.

55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con enzastaurina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con epirubicina.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con epítolona B.

65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ERA-923.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con cetuximab.
- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con erlotinib.
- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con estradiol.
- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con estramustina.
- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con etopósido.
- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con everolimus.
- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ficlatuzumab.
- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con finasterida.
- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con flavopiridol.
- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con floxuridina.
- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con fludrocortisona.
- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con fluoximesterona.
- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con flutamida.
- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con el régimen FOLFOX.
- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un

anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con fulvestrant.

5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con galeterona.

10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con gefitinib.

15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con gemcitabina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con gimitecán.

20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con glicopiranosil lípido A.

25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con goserelina.

30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acetato de goserelina.

35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con gosipol.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con GSK461364.

40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con GSK690693.

45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con HMR-3339.

50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con caproato de hidroxiprogesterona.

55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con hidrox urea.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con IC87114.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con idarrubicina.

65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con idoxifeno.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ifosfamida.

5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con IM862.

10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con imatinib.

15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con imiquimod.

20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con IMC-1C11.

25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con INCB24360.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con INO1001.

30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con interferón.

35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con interleucina-2 (IL-2).

40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con interleucina-12 (IL-12).

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ipilimumab.

45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con irinotecán.

50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con JNJ-16241199.

55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ketoconazol.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con KRX-0402.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con lapatinib.

65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un

anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con lasofoxifeno.

5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con letrozol.

10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con leucovorina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención está en asociación con leuprolida.

15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acetato de leuprolida.

20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con levamisol.

25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con paclitaxel atrapado en liposomas.

30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con lomustina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con lonafarnib.

35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con lucantona.

40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con LY292223.

45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con LY292696.

50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con LY293646.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con LY293684.

55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con LY294002.

60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con LY317615.

65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con marimastat.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mecloretamina.

- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acetato de medroxiprogesterona.

- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con acetato de megestrol.

- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con melfalán.

- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mercaptopurina.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mesna.

- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con metotrexato.

- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mitramicina.

- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mitomicina.

- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mitotano.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mitoxantrona.

- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tozasertib.

- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con una suspensión de *Mycobacterium obuense* desactivado por calor.

- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con MLN8054.

- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con neovastat.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con neratinib.

- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PD184352.

- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PEG-interferón.

- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con pemetrexed.

- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con pentostatina.

- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con perifosina.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mostaza de fenilalanina.

- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PI-103.

- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con pictilisib.

- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PIK-75.

- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con pipendoxifeno.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PKI-166.

- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con plicamicina.

- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con poli-ICLC.

- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con el porfímero.

- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con prednisona.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con procarbazona.

- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación

con progestinas.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con un polisacárido unido a la proteína PSK (procedente de *Basidiomycetes coriolus versicolor*).

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PX-866.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con R-763.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con raloxifeno.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con raltitrexed.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con razoxina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ridaforolimus.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con rituximab.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con romidepsina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con RTA744.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con rubitecán.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con scriptaid.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con Sdx102.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con seliciclib.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con selumetinib.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con semaxanib.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con SF1126.

- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con sirolimus.

- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con SN36093.

- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con sorafenib.

- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con espirolactona.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con escualamina.

- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con SR13668.

- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con estreptozocina.

- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con SU6668.

- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ácido hidroxámico suberoilanalida.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con sunitinib.

- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con estrógeno sintético.

- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con talampanel.

- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con el talimogén laherparevec.

- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tamoxifeno.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con temozolomida.

- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación

con temsirolimus.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tenipósido.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tesmilifeno.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con testosterona.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tetrandrina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con TGX-221.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con talidomida.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con 6-tioguanina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tiotepa.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ticilimumab.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tipifarnib.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tivozanib.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con TKI-258.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con TLK286.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con topotecán.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con citrato de toremifeno.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con trabectedina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con trastuzumab.

- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tretinoína.

- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tricostatina A.

- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con tricitabina monohidrato.

- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con pamoato de triptorelina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con TSE-424.

- 25 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

- 30 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con mostaza de uracilo.

- 35 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ácido valproico.

- 40 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con valrubicina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vandetanib.

- 45 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vatalanib.

- 50 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con trampa de VEGF.

- 55 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vinblastina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vincristina.

- 60 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vindesina.

- 65 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación

con vinorelbina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vitaxina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vitespán.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con vorinostat.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con VX-745.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con wortmanina.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con Xr311.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con zanolimumab.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con un extracto de *Bacillus tuberculosis* en agua caliente Z-100.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ZK186619.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ZK-304709.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ZM336372.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ZSTK474.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con casopitant.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con netupitant.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con un antagonista del receptor NK-1.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con palonosetrón.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con BGJ398.

- 5 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con INC280.

- 10 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con PLX8394.

- 15 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con ornatuzumab.

- 20 En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con natitoclax.

- En una realización de la invención, un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo humanizado antagonista) de la presente invención está en asociación con aflibercept.

- 25 La expresión "en asociación con" indica que los componentes, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como los anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención junto con otro agente tal como pembrolizumab o nivolumab, puede formularse en una sola composición, p. ej., para su suministro simultáneo, o formularse por separado en dos o más composiciones (p. ej., un kit). Cada componente se puede administrar a un sujeto en un momento diferente al momento cuando se administra el otro componente; por ejemplo, cada administración puede administrarse de forma no simultánea (p. ej., por separado o secuencialmente) a intervalos durante un período de tiempo determinado. Asimismo, los componentes separados pueden administrarse a un sujeto por la misma vía o por una diferente (p. ej., en donde un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por vía parenteral y paclitaxel se administra por vía oral.

35 **Ensayos y usos experimentales y de diagnóstico**

- La presente invención incluye cualquier método para formar un complejo entre un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y LAG3 (p. ej., LAG3 humana o de mono cynomolgus) que comprende poner en contacto el polipéptido LAG3 con el anticuerpo o fragmento anti-LAG3 en condiciones adecuadas para la unión y la formación de complejos.

- 45 Los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento se pueden usar como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se inmovilizan en una fase sólida tal como sephadex, resina de vidrio o agarosa o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo o fragmento inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína LAG3 (o un fragmento de la misma) para purificarlo, y, a continuación, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína LAG3 que está unida al anticuerpo o fragmento inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con un disolvente que eluye la LAG3 unida (p. ej., proteína A). Dichos anticuerpos y fragmentos inmovilizados forman parte de la presente invención.

- La presente invención proporciona métodos para usar los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención para determinar el grado de activación de linfocitos T que un sujeto particular está teniendo o podría tener en el presente del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, las realizaciones de la invención incluyen métodos que incluyen (i) poner en contacto linfocitos T (p. ej., linfocitos T CD4+) de un sujeto con superantígeno (p. ej., uno o más de un superantígeno estafilocócico tal como SEA, SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus*), SEC2, SEC3, SED, SEH y/o TSST; y/o uno o más de un superantígeno estreptocócico como SPE-A, SPE-C, SPE-H y/o SMEZ-2), p. ej., a una concentración de 500 pg/ml o más, tal como aproximadamente 10 ng/ml o 100 ng/ml, en presencia del anticuerpo o fragmento anti-LAG3 (opcionalmente, los linfocitos T se incuban previamente con el superantígeno (p. ej., SEB) y el anticuerpo o fragmento durante aproximadamente 48 o 72 horas) y (ii) determinar el nivel de producción de citocina (p. ej., TNF-alfa, GM-CSF, IFN-gamma y/o IL-2) de dichos linfocitos T; en donde el nivel de producción de dicha o dichas citocinas indica el nivel de activación de linfocitos T en el momento del anticuerpo o fragmento. Los sujetos que poseen linfocitos T que muestran producción de citocinas (p. ej., altos niveles de producción de citocinas tal como un aumento de las mismas dependiente de anti-LAG3) en presencia de superantígeno y anticuerpo se consideran candidatos superiores para recibir el anticuerpo o fragmento como terapia,

p. ej., para tratar cáncer o infección. En una realización de la invención, dichos candidatos superiores se seleccionan para recibir el anticuerpo o fragmento. En una realización de la invención, a dichos candidatos superiores se les administra una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento. En una realización de la invención, el método incluye la etapa de aislar los linfocitos T de la sangre del sujeto. En una realización de la invención, los linfocitos T se ponen en contacto con el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y pembrolizumab.

Se proporcionan además antígenos para generar anticuerpos secundarios que son útiles, por ejemplo, para realizar transferencias Western y otros inmunoensayos analizados en el presente documento. En particular, se divulgan polipéptidos que comprenden las regiones variables y/o secuencias CDR de un anticuerpo o fragmento anti-LAG3 divulgado en el presente documento y que pueden usarse para generar anticuerpos antiidiotípicos para su uso en la detección específica de la presencia del anticuerpo, p. ej., en un contexto terapéutico.

La presente invención incluye métodos ELISA basados en células que utilizan los anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. En una realización de la invención, el método incluye las etapas: (i) poner en contacto las células (p. ej., células o tejido extraído de un tumor, p. ej., que incluyen linfocitos sospechosos de expresar LAG3) inmovilizadas en una superficie sólida (p. ej., una microplaca) para analizar la presencia de LAG3 con un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, (ii) opcionalmente lavar la mezcla para eliminar el anticuerpo o fragmento anti-LAG3 no unido, (iii) poner en contacto el anticuerpo o fragmento anti-LAG3 con un anticuerpo secundario marcado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al anticuerpo anti-LAG3, (iv) opcionalmente lavar el complejo para eliminar los anticuerpos o fragmentos no unidos y (v) detectar la presencia del marcador en el anticuerpo o fragmento secundario; en donde la detección del marcador indica que las células contienen LAG3. Por ejemplo, la presente invención incluye dichos métodos ELISA basados en células para identificar células LAG3+ en una muestra tumoral.

La presente invención incluye ensayos ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas) que incorporan el uso de un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmentos de unión a antígeno del mismo divulgados en el presente documento.

Por ejemplo, dicho un método comprende las siguientes etapas:

- (a) recubrir un sustrato (p. ej., la superficie de un pocillo de una placa de microtitulación, p. ej., una placa de plástico) con anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
- (b) aplicar una muestra para analizar la presencia de LAG3 al sustrato (p. ej., células extraídas de un tumor, p. ej., que incluyen linfocitos sospechosos de expresar LAG3);
- (c) lavar la placa, de modo que se elimine el material no unido en la muestra;
- (d) aplicar anticuerpos marcados de manera detectable (p. ej., anticuerpos ligados a enzimas) que también son específicos del antígeno LAG3;
- (e) lavar el sustrato, para que se eliminen los anticuerpos marcados, no unidos;
- (f) si los anticuerpos marcados están ligados a enzimas, aplicar una sustancia química que la enzima convierta en una señal fluorescente; y
- (g) detectar la presencia del anticuerpo marcado.

La detección del marcador asociado con el sustrato indica la presencia de la proteína LAG3. Los métodos ELISA también se pueden utilizar para identificar células LAG3+ en una muestra tumoral.

En una realización adicional, el anticuerpo marcado o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con peroxidasa que reacciona con ABTS (p. ej., ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, para producir un cambio de color que sea detectable. Como alternativa, el anticuerpo o fragmento marcado está marcado con un radioisótopo detectable (p. ej., ^3H) que puede detectarse mediante un contador de centelleo en presencia de un centelleante.

Un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede usarse en un procedimiento de transferencia Western o de inmunotransferencia de proteínas. Dicho procedimiento forma parte de la presente invención e incluye, p. ej.:

- (1) proporcionar una membrana u otro sustrato sólido que comprende una muestra para analizar la presencia de LAG3, p. ej., incluyendo opcionalmente la etapa de transferir proteínas de una muestra para analizar la presencia de LAG3 (p. ej., de una separación electroforética PAGE o SDS-PAGE de las proteínas en la muestra) a una membrana u otro sustrato sólido usando un método conocido en la técnica (p. ej., transferencia semiseca o transferencia en tanque); y poner en contacto la membrana u otro sustrato sólido para analizar la presencia de LAG3 o un fragmento de la misma con un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

Dicha membrana puede tomar la forma, por ejemplo, de una membrana basada en nitrocelulosa o vinilo (p. ej., fluoruro

de polivinilideno (PVDF)) en la que se analizarán las proteínas que se van a probar para determinar la presencia de LAG3 en un gel de PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) no desnaturizante o gel de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) se han transferido (p. ej., después de la separación electroforética en el gel). Antes del contacto de la membrana con el anticuerpo o fragmento anti-LAG3, la membrana se bloquea opcionalmente, p. ej., con leche en polvo desnatada o similar para unir sitios de unión a proteínas inespecíficos en la membrana.

(2) lavar la membrana una o más veces para eliminar el anticuerpo o fragmento anti-PLAG3 no unido y otras sustancias no unidas; y

(3) detectar el anticuerpo o fragmento anti-LAG3 unido.

La detección del anticuerpo o fragmento unido indica que la proteína LAG3 está presente en la membrana o sustrato y en la muestra. La detección del anticuerpo o fragmento unido se puede realizar uniéndolo al anticuerpo o fragmento con un anticuerpo secundario (un anticuerpo anti-inmunoglobulina) que está marcado de manera detectable y, a continuación, detectando la presencia del marcador del anticuerpo secundario.

Los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento también se pueden usar para inmunohistoquímica. Dicho método forma parte de la presente invención y comprende, p. ej.,

(1) poner en contacto tejido que comprende TIL y células tumorales (p. ej., tumor de melanoma) para analizar la presencia de proteína LAG3 con un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención; y

(2) detectar el anticuerpo o fragmento sobre o en los TIL.

Si el anticuerpo o el propio fragmento está marcado de manera detectable, este puede detectarse directamente. Como alternativa, el anticuerpo o fragmento puede unirse mediante un anticuerpo secundario marcado de forma detectable en donde después se detecta el marcador.

Determinados anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento, también pueden usarse para la obtención de imágenes tumorales *in vivo*. Dicho método puede incluir la inyección de un anticuerpo anti-LAG3 marcado de manera detectable, p. ej., radiomarcado, o fragmento de unión a antígeno del mismo (como se divulga en el presente documento) en el cuerpo de un paciente para analizar la presencia de un tumor asociado con la expresión de LAG3 (p. ej., que expresa LAG3, por ejemplo, en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL)) seguido de obtención de imágenes, p. ej., obtención nuclear de imágenes, del cuerpo del paciente para detectar la presencia del anticuerpo o fragmento marcado, p. ej., en lugares que comprenden una alta concentración del anticuerpo o fragmento que se une al o se asocia con el tumor. La detección de los lugares indica la presencia de los TIL LAG3⁺ en un tumor.

Las técnicas de obtención de imágenes incluyen imágenes SPECT (por sus siglas en inglés) (tomografía de emisión monofotónica) o imágenes PET (por sus siglas en inglés) (tomografía de emisión positrónica). Los marcadores incluyen, p. ej., yodo-123 (¹²³I) y tecnecio 99m (^{99m}Tc), p. ej., junto con obtención de imágenes SPECT u ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O o ¹⁸F, p. ej., junto con obtención de imágenes PET o indio-111 (véase, p. ej., Gordon *et al.*, (2005) *International Rev. Neurobiol.* 67:385-440).

La presente invención proporciona un método para determinar si un tumor en un sujeto es sensible al tratamiento con un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende determinar si la LAG3 se expresa en o sobre los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y, si se identifica dicha expresión, determinando que el tumor es sensible a dicho tratamiento. Se puede determinar que los TIL expresan LAG3 usando cualquiera de los métodos expuestos en el presente documento, p. ej., ELISA u obtención de imágenes *in vivo*. En una realización de la invención, el método comprende la etapa de obtener una muestra de dicho tejido tumoral antes de realizar la determinación de la expresión de LAG3. Por ejemplo, en una realización de la invención, la muestra se obtiene quirúrgicamente, p. ej., por biopsia, por ejemplo, biopsia con aguja o tumorectomía parcial. En una realización de la invención, la expresión de LAG3 se determina poniendo en contacto los TIL con el anticuerpo o fragmento y detectando la presencia del anticuerpo o fragmento unido al tejido o fragmento tumoral.

Composiciones farmacéuticas y administración

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles de los anticuerpos anti-LAG3 (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., 4A10, 19E8, 11C9 y/o 22D2; p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8 y/o Ab9), el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Véanse, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences y Farmacopea de los Estados Unidos: Formulario nacional, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Dichas composiciones son parte de la presente invención.

El alcance de la presente invención incluye composiciones desecadas, p. ej., secadas por congelación, que

comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención o una composición farmacéutica del mismo que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable pero que carece sustancialmente de agua.

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mezclando con vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables en forma de, p. ej., polvos liofilizados, suspensiones acuosas, soluciones o suspensiones acuosas (véanse, p. ej., Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

La presente invención incluye cualquier formulación farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, y PO_4^{2-} , por ejemplo, fosfato de sodio o fosfato de potasio (p. ej., aproximadamente 10 mM), NaCl (p. ej., aproximadamente 7,5 mM) y sacarosa (p. ej., aproximadamente al 3 %), p. ej., que tienen un pH de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,3; o NaOAc (p. ej., aproximadamente 20 mM) y sacarosa (aproximadamente al 7 o aproximadamente al 9 %), p. ej., que tienen un pH de aproximadamente 5,0.

La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos o fragmentos, administradas solas o en combinación con otro agente, se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico ($\text{DL}_{50}/\text{DE}_{50}$). En aspectos particulares, son deseables anticuerpos que presenten índices terapéuticos altos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración.

En una realización adicional, un agente terapéutico adicional que se administra a un sujeto en asociación con un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 de la invención se administra al sujeto de acuerdo con Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57a edición (1 de noviembre de 2002)).

El modo de administración puede variar. Las vías de administración incluyen oral, rectal, transmucosa, intestinal, parenteral; intramuscular, subcutánea, intradérmica, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, intraocular, inhalación, insuflación, tópica, cutánea, transdérmica o intraarterial.

También se divulgan en el presente documento métodos para administrar un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden la introducción del anticuerpo o fragmento en el cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, el método comprende perforar el cuerpo del sujeto con una aguja de una jeringa e inyectar el anticuerpo o fragmento en el cuerpo del sujeto, p. ej., en la vena, arteria, tumor, tejido muscular o hipodermis del sujeto.

La presente invención proporciona un recipiente (p. ej., un vial de plástico o vidrio, p. ej., con tapa o una columna de cromatografía, aguja hueca o un cilindro de jeringa) que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, polipéptidos o polinucleótidos de la invención, o una composición farmacéutica de los mismos que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un dispositivo de inyección que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, polipéptidos o polinucleótidos de la invención o una composición farmacéutica de los mismos. Un dispositivo de inyección es un dispositivo que introduce una sustancia en el cuerpo de un paciente por vía parenteral, p. ej., intramuscular, subcutánea o intravenosa. Por ejemplo, un dispositivo de inyección puede ser una jeringa (p. ej., precargada con la composición farmacéutica, tal como un autoinyector) que, por ejemplo, incluye un cilindro o barril para contener el fluido que se va a inyectar (p. ej., que comprende el anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo), una aguja para unir la piel y/o los vasos sanguíneos para la inyección del fluido; y un émbolo para empujar el fluido fuera del cilindro y a través del orificio de la aguja. En una realización de la invención, un dispositivo de inyección que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo es un dispositivo de inyección intravenosa (IV). Dicho dispositivo incluye el anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo en una cánula o trocar/aguja que se puede fijar a un tubo que se puede fijar a una bolsa o depósito para contener líquido (p. ej., solución salina; o solución de ringer lactato que comprende NaCl, lactato sódico, KCl, CaCl_2 y que incluye, opcionalmente, glucosa) introducido en el cuerpo del paciente a través de la cánula o trocar/aguja. El anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo puede, en una realización de la invención, introducirse en el dispositivo una vez que el trocar y la cánula se insertan en la vena de un sujeto y el trocar se retira de la cánula insertada. El dispositivo intravenoso puede, por ejemplo, insertarse en una vena periférica (p. ej., en la mano o el brazo); la vena cava superior o la vena

cava inferior, o dentro de la aurícula derecha del corazón (p. ej., una vía IV central); o en una vena subclavia, yugular interna, o femoral y, por ejemplo, hacerse avanzar hacia el corazón hasta alcanzar la vena cava superior o la aurícula derecha (p. ej., una línea venosa central). En una realización de la invención, un dispositivo de inyección es un autoinyector; un inyector de chorro o una bomba de infusión externa. Un inyector de chorro utiliza un chorro estrecho de líquido a alta presión que penetra en la epidermis para introducir el anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo en el cuerpo de un paciente. Las bombas de infusión externas son dispositivos médicos que suministran el anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo en el cuerpo de un paciente en cantidades controladas. Las bombas de infusión externas pueden accionarse eléctrica o mecánicamente. Las diferentes bombas funcionan de diferentes formas, por ejemplo, una bomba de jeringa contiene líquido en el depósito de una jeringa, y un pistón móvil controla el suministro de líquido, una bomba elastomérica contiene el líquido en un depósito de globo extensible y la presión de las paredes elásticas del globo impulsa el suministro de líquido. En una bomba peristáltica, un juego de rodillos aprieta un tramo de tubo flexible, empujando el líquido hacia adelante. En una bomba multicanal, los líquidos se pueden suministrar desde múltiples depósitos a múltiples velocidades.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento también se pueden administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja; tal como los dispositivos divulgados en los documentos de patentes de Estados Unidos n.º 6.620.135; 6.096.002; 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556. Dichos dispositivos sin aguja que comprenden la composición farmacéutica también forman parte de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento también se pueden administrar mediante infusión. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos para administrar las composiciones farmacéuticas incluyen los divulgados en: la Patente de Estados Unidos n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar un medicamento a una tasa controlada; la Patente de Estados Unidos n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para suministrar un medicamento a una tasa de infusión precisa; la Patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármacos; la Patente de Estados Unidos n.º 4.439.196, que divulga un sistema de suministro osmótico de fármacos que tiene compartimentos multicámara. Muchos otros de estos implantes, sistemas y módulos de suministro son bien conocidos por los expertos en la materia y los que comprenden las composiciones farmacéuticas de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención.

Como alternativa, se puede administrar el anticuerpo (p. ej., anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno anti-LAG3 de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del anticuerpo o fragmento directamente en un tumor, p. ej., un tumor LAG3⁺. Asimismo, se puede administrar el anticuerpo o fragmento en un sistema de suministro de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido, que se dirige, por ejemplo, a un tumor, p. ej., un tumor LAG3⁺, p. ej., caracterizado por inmunopatología. Los liposomas se dirigirán a y se captarán de manera selectiva por el tejido afectado. Dichos métodos y liposomas son parte de la presente invención.

"Tratar" o "que trata" significa administrar anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención, a un sujeto que tiene uno o más síntomas de una enfermedad para la que los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno anti-LAG3 son eficaces, p. ej., en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer o una enfermedad infecciosa, o se sospecha que tiene cáncer o enfermedad infecciosa, para lo cual el agente tiene actividad terapéutica. Normalmente, el anticuerpo o fragmento se administra en una "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" que aliviará uno o más síntomas (p. ej., de cáncer o enfermedad infecciosa) en el sujeto o la población tratados, ya sea induciendo la regresión o eliminación de dichos síntomas o inhibiendo la progresión de dichos síntomas, p. ej., síntomas de cáncer tal como crecimiento de tumores o metástasis, por cualquier grado clínicamente medible. Una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento puede variar dependiendo de factores tales como la etapa de la enfermedad, la edad y el peso del paciente y la capacidad del fármaco para desencadenar una respuesta deseada en el sujeto.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanizados tales como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento pueden proporcionarse mediante infusión continua o mediante dosis administradas, p. ej., diariamente, 1-7 veces a la semana, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente, trimestralmente, cada seis meses, anualmente, etc. Se pueden proporcionar dosis, p. ej., por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intramedular o por inhalación. Una dosis eficaz de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, es de aproximadamente 0,1 mg/kg (peso corporal) a aproximadamente 100 mg/kg (peso corporal), p. ej., para el tratamiento o prevención de cáncer o enfermedades infecciosas. En una realización de la invención, una dosis eficaz para el tratamiento de una afección médica, en donde se produce la sobreexpresión de LAG3, es la dosis a la que se produce la saturación completa del antígeno LAG3 en el cuerpo del sujeto, p. ej., en linfocitos T dentro de los tumores del sujeto o en donde hay aproximadamente un 10 % de saturación o más de aproximadamente un 10 %.

El facultativo realiza la determinación de la dosis adecuada, p. ej., utilizando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica que afectan al tratamiento. Generalmente, en la determinación de la dosis, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y a continuación se incrementa en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de

diagnóstico importantes incluyen las de síntomas de, p. ej., la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas. En general, es deseable que un producto biológico que se va a utilizar proceda de la misma especie que el animal diana para el tratamiento, minimizando de este modo cualquier respuesta inmunitaria al reactivo. En el caso de sujetos humanos, por ejemplo, pueden ser deseables anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos o fragmentos anti-LAG3 (véase, p. ej., Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343: 1594-1602).

El alivio de un síntoma de la enfermedad puede evaluarse mediante cualquier medida clínica utilizada normalmente por los médicos u otros proveedores de atención médica capacitados para evaluar la gravedad o el estado de progresión de ese síntoma. Aunque una realización de la presente invención (p. ej., un método de tratamiento o un artículo de fabricación) puede que no sea eficaz para aliviar el síntoma o los síntomas de la enfermedad diana en cada sujeto, debería aliviar el síntoma o los síntomas de la enfermedad diana en un número estadísticamente significativo de sujetos como se determina por cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba t de Student, la prueba χ^2 , la prueba U de acuerdo con Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

Kits

Se proporcionan además kits que comprenden uno o más componentes que incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno anti-LAG3, como se analiza en el presente documento en asociación con uno o más componentes adicionales que incluyen, pero sin limitación, un agente terapéutico adicional, como se analiza en el presente documento. El anticuerpo o fragmento y/o el agente terapéutico se pueden formular como una composición pura o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una composición farmacéutica.

En una realización, el kit incluye un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención o una composición farmacéutica del mismo en un recipiente (p. ej., en un vial de vidrio o plástico estéril) y un agente terapéutico adicional en otro recipiente (p. ej., en un vial de vidrio o plástico estéril).

En otra realización, el kit comprende una combinación de la invención, que incluye un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención o una composición farmacéutica del mismo en combinación con uno o más agentes terapéuticos formulados juntos, opcionalmente, en una composición farmacéutica, en un solo contenedor común.

Si el kit incluye una composición farmacéutica para administración parenteral a un sujeto, el kit puede incluir un dispositivo para realizar dicha administración. Por ejemplo, el kit puede incluir una o más agujas hipodérmicas u otros dispositivos de inyección como se analiza anteriormente. Por tanto, la presente invención incluye un kit que comprende un dispositivo de inyección y el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, p. ej., en donde el dispositivo de inyección incluye el anticuerpo o fragmento o en donde el anticuerpo o fragmento está en un recipiente separado.

El kit puede incluir un prospecto que incluya información sobre las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación del kit. Generalmente, dicha información ayuda a los pacientes y médicos a usar las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación adjuntas de manera eficaz y segura. Por ejemplo, la siguiente información sobre una combinación de la invención se puede proporcionar en el prospecto: farmacocinética, farmacodinámica, estudios clínicos, parámetros de eficacia, indicaciones y uso, contraindicaciones, advertencias, precauciones, reacciones adversas, sobredosis, dosis y administración adecuadas, cómo suministrarlo, condiciones adecuadas de almacenamiento, referencias, información sobre el fabricante/distribuidor e información sobre patentes.

Kits de detección y kits terapéuticos

Por cuestiones de conveniencia, un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede proporcionar en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico o detección. Cuando el anticuerpo o fragmento está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (p. ej., un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar unas concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse en forma de polvos secos,

habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que, en disolución, proporcionarán una solución de reactivos que tiene la concentración apropiada.

También se proporcionan reactivos y kits de diagnóstico o detección que comprenden uno o más de dichos reactivos para su uso en varios ensayos de detección, incluyendo, p. ej., inmunoanálisis tales como ELISA (de tipo sándwich o de formato competitivo). Los componentes del kit se pueden fijar previamente a un soporte sólido o se pueden aplicar a la superficie de un soporte sólido cuando se utiliza el kit. En algunas realizaciones de la invención, los medios de generación de señales pueden venir previamente asociados a un anticuerpo o fragmento de la invención o pueden requerir la combinación con uno o más componentes, p. ej., tampones, conjugados de anticuerpo y enzima, sustratos de enzimas, o similares, antes de su uso. Los kits también pueden incluir reactivos adicionales, p. ej., reactivos de bloqueo para reducir la unión inespecífica a la superficie de la fase sólida, reactivos de lavado, sustratos de enzimas y similares. La superficie de la fase sólida puede ser en forma de tubo, una perla, una placa de microtitulación, una microesfera u otros materiales adecuados para inmovilizar proteínas, péptidos o polipéptidos. En aspectos particulares, una enzima que cataliza la formación de un producto quimioluminiscente o cromogénico o la reducción de un sustrato quimioluminiscente o cromogénico es un componente de los medios de generación de señales. Dichas enzimas se conocen bien en la materia. Los kits pueden comprender cualquiera de los agentes de captura y reactivos de detección descritos en el presente documento. Opcionalmente, el kit también puede comprender instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

También se proporciona un kit que comprende un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo empaquetado en un recipiente, tal como un vial o botella, y que además comprende una etiqueta adherida o empaquetada con el recipiente, describiendo la etiqueta el contenido del recipiente y proporcionando indicaciones y/o instrucciones con respecto al uso del contenido del recipiente para tratar una o más patologías como se describe en el presente documento.

En un aspecto, el kit es para tratar cáncer y comprende un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., un anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente terapéutico adicional o una vacuna. El kit puede incluir opcionalmente además una jeringa para administración parenteral, p. ej., intravenosa. En otro aspecto, el kit comprende un anticuerpo anti-LAG3 (p. ej., anticuerpo humanizado tal como anticuerpos antagonistas humanizados) o un fragmento de unión a antígeno del mismo y una etiqueta fijada a o empaquetada con el recipiente que describe el uso del anticuerpo o fragmento con la vacuna o agente terapéutico adicional. En otro aspecto más, el kit comprende la vacuna o agente terapéutico adicional y una etiqueta fijada a o empaquetada con el recipiente que describe el uso de la vacuna o agente terapéutico adicional con el anticuerpo o fragmento anti-LAG3. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-LAG3 y una vacuna o un agente terapéutico adicional están en viales separados o se combinan juntos en la misma composición farmacéutica.

Como se analiza anteriormente en la sección de terapia de combinación, la administración simultánea de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, siempre que exista una superposición en el período de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, al igual que la administración en diferentes días o semanas.

Los kits terapéuticos y de detección divulgados en el presente documento también se pueden preparar para que comprendan al menos uno de los anticuerpos, péptido, fragmento de unión a antígeno o polinucleótido divulgado en el presente documento e instrucciones para usar la composición como reactivo de detección o agente terapéutico. Los recipientes para su uso en dichos kits pueden comprender normalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, una jeringa u otro recipiente adecuado, en el que pueden colocarse una o más de las composiciones de detección y/o terapéutica, y preferentemente, dividirse de manera adecuada en alícuotas. Cuando también se proporcione un segundo agente terapéutico, el kit también puede contener un segundo recipiente distinto en el que se puede colocar esta segunda composición de detección y/o terapéutica. Como alternativa, se pueden preparar una pluralidad de compuestos en una única composición farmacéutica, y pueden envasarse en un único medio de recipiente, tal como un vial, matraz, jeringa, frasco u otros medios únicos de recipiente adecuados. Los kits divulgados en el presente documento también incluirán normalmente un medio para contener el vial o los viales en confinamiento cerrado para la venta comercial, tales como, p. ej., recipientes de plástico inyectables o moldeados por soplado en los que se conserva el o los viales deseados. Cuando un radiomarcador, cromogénico fluorogénico u otro tipo de marcador detectable o medio de detección se incluye dentro del kit, el agente marcador puede proporcionarse en el mismo recipiente que el de la propia composición de detección o terapéutica, o de manera alternativa puede colocarse en un segundo medio de recipiente distinto en el que esta segunda composición puede colocarse y dividirse convenientemente en alícuotas. Como alternativa, el reactivo de detección y el marcador pueden prepararse en un solo medio de recipiente, y en la mayoría de los casos, el kit también incluirá normalmente un medio para contener el vial o los viales en confinamiento cerrado para la venta comercial y/o el envasado y suministro convenientes.

En el presente documento también se proporciona un dispositivo o aparato para llevar a cabo los métodos de detección o monitorización descritos en el presente documento. Dicho aparato puede incluir una cámara o un tubo en el que se puede introducir la muestra, un sistema de manipulación de líquidos que incluye opcionalmente válvulas o bombas para dirigir el flujo de la muestra a través del dispositivo, opcionalmente filtros para separar el plasma o el suero de la sangre, cámaras de mezclado para la adición de agentes de captura o reactivos de detección y, opcionalmente, un

dispositivo de detección para detectar la cantidad de marcador detectable unido al inmunocomplejo del agente de captura. El flujo de muestra puede ser pasivo (p. ej., mediante fuerzas capilar, hidrostática u otras fuerzas que no requieren una manipulación adicional del dispositivo una vez aplicada la muestra) o activo (por ejemplo, mediante la aplicación de una fuerza generada mediante bombas mecánicas, bombas electroosmóticas, fuerza centrífuga o aumento de la presión del aire), o mediante una combinación de fuerzas activas y pasivas.

En realizaciones adicionales, también se proporciona un procesador, una memoria legible por ordenador y una rutina almacenada en la memoria legible por ordenador y adaptada para ejecutarse en el procesador para realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Ejemplos de sistemas informáticos, entornos, y/o configuraciones adecuados incluyen ordenadores personales, ordenadores servidores, dispositivos manuales o portátiles, sistemas multiprocesadores, sistemas basados en microprocesadores, decodificadores, electrónica de consumo programable, PC de red, miniordenadores, ordenadores centrales, entornos informáticos distribuidos que incluyen cualquiera de los sistemas o dispositivos anteriores, o cualquier otro sistema conocido en la materia.

MÉTODOS GENERALES

Se describen métodos convencionales en biología molecular en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1982 y 1989 2ª edición, 2001 3ª Edición) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). También aparecen métodos convencionales en Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley y Sons, Inc. Nueva York, NY, que describen la clonación en células bacterianas y la mutagénesis de ADN (vol. 1), la clonación en células de mamífero y levadura (vol. 2), glucoconjugados y expresión de proteínas (vol. 3) y bioinformática (vol. 4).

Se describen métodos de purificación de proteínas, incluida la inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización, en Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York). Se describen análisis químicos, modificación química, modificación postraduccional, producción de proteínas de fusión, glicosilación de proteínas (véase, p. ej., Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley y Sons, Inc., NY, NY, págs. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; págs. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., págs. 384-391). Se describe la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*). Están disponibles técnicas convencionales para caracterizar interacciones ligando/receptor (véase, p. ej., Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados (véanse, p. ej., Sheperd y Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, Nueva York, NY; Kontermann y Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Nueva York; Harlow y Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 139-243; Carpenter, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342:877-883; Foote y Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; la Patente de Estados Unidos N.º 6.329.511).

Una alternativa a la humanización es utilizar bibliotecas de anticuerpos humanos mostradas en fagotecas o bibliotecas de anticuerpos humanos en ratones transgénicos (Vaughan *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom y Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas *et al.* (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Kay *et al.* (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

Se describen anticuerpos monocatenarios y diacuerpos (véanse, p. ej., Malecki *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson y Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; y la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778). Se proporcionan anticuerpos bifuncionales (véanse, p. ej., Mack, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel, *et al.* (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, *et al.* (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, *et al.* (1985) *Science* 229:81-83; Raso, *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; y las patentes de los Estados Unidos n.º 5.932.448, 5.532.210 y 6.129.914).

También se proporcionan anticuerpos biespecíficos (véase, p. ej., Azzoni *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

La purificación del antígeno no es necesaria para la generación de anticuerpos. Los animales pueden inmunizarse con células que llevan el antígeno de interés. Los esplenocitos pueden aislarse después de los animales inmunizados y los esplenocitos pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para producir un hibridoma (véanse, p. ej., Meyaard *et al.* (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright *et al.* (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston *et al.*, *supra*; Kaithamana *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Los anticuerpos se pueden conjugar, p. ej., con pequeñas moléculas de fármaco, enzimas, liposomas, polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos son útiles para fines terapéuticos, de diagnóstico, kit u otros e incluyen anticuerpos acoplados, p. ej., a colorantes, radioisótopos, enzimas o metales, p. ej., oro coloidal (véanse, p. ej., Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing y Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Están disponibles métodos de citometría de flujo, incluyendo clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), están disponibles (véanse, p. ej., Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ). Están disponibles reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos, para su uso, p. ej., como reactivos de diagnóstico, (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Se describen métodos convencionales de histología del sistema inmunitario (véane, p. ej., Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

Están disponibles paquetes de programas informáticos y bases de datos para determinar, p. ej., fragmentos antigénicos, secuencias líderes, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineaciones de secuencias, (véanse, p. ej., GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Ejemplos

Estos ejemplos están destinados a ejemplificar la presente invención y no son una limitación de la misma. Las composiciones y métodos expuestos en los ejemplos forman parte de la presente invención.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos contra LAG3 humana.

Para generar anticuerpos contra LAG3 humana, se inmunizaron ratones Balb/C con 5 µg de proteína recombinante etiquetada con LAG3-hFc humana usando adyuvante RIBI e inyección en la almohadilla plantar en un programa quincenal. Se extrajo sangre de los ratones inmunizados y se determinaron los títulos séricos para determinar la unión a células CHOK1 transfectadas con LAG3 humana usando un ELISA basado en células (descrito a continuación). Los ratones con los títulos más altos recibieron un refuerzo final con proteína recombinante y se aislaron los ganglios linfáticos poplíteos de drenaje cuatro días después. Los hibridomas se generaron por electrofusión de linfocitos aislados con el compañero de fusión de mieloma P3X63-AG8.653 utilizando el sistema de electrofusión Cytopulse Hybrimmune. Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pocillos en DMEM/F12, BCS al 15 %, HAT, IL-6, complemento OPI y gentamicina.

Los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron para determinar la unión a células CHOK1 que expresaban LAG3 humana y la reactividad cruzada con células CHO que expresaban LAG3 de cynomolgus usando un formato ELISA basado en células. Las células CHO-K1 que expresaban LAG3 humana y LAG3 de cynomolgus se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos en 50 µl de DMEM/F12, BCS al 10 % y gentamicina (medio CHO-K1). Las células se sembraron a 2x10⁴ células/pocillo dos días antes del ensayo o 4x10⁴ células/pocillo un día antes del ensayo. Se retiró el medio de los pocillos antes del ensayo y se añadieron 50 µl de sobrenadante de hibridoma. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron durante 30-60 minutos a 37 °C y se lavaron 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 % usando un protocolo de lavado ELISA de células en el lavador de placas Biotek EL405x Select CW. Se añadieron cincuenta microlitros del anticuerpo de detección, anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (Southern Biotech n.º de cat 1031-05), a una dilución 1:2000 en medio CHO-K1 y se incubaron a 37 °C durante 30-60 minutos. Las placas de ensayo se lavaron como anteriormente y se revelaron con TMB y se detuvieron con la solución de parada de TMB (KPL n.º de cat 50-85-06). Se determinó la absorbancia a 450 nm-620 nm.

Los hibridomas positivos se subclonaron mediante dilución limitante o se subclonaron sembrando en placas hibridomas en medio semisólido y los clones se seleccionaron en el ClonePix (Genetix). Los subclones finales se hicieron crecer en cultivos a pequeña escala en medio de producción de hibridoma sin suero y se purificaron con

columnas de centrifugación de proteína G para generar anticuerpo purificado para una caracterización adicional. Se caracterizaron adicionalmente anticuerpos purificados de los clones LB145.22D2.E1.1D1 (22D2), LB148.19E8.G1.1A1 (19E8), LB148.4A10.1H1 (4A10) y LB148.11C9.1C1 (11C9) y se realizó la secuenciación de V_H y V_L .

5 Ejemplo 2. Unión de anticuerpos anti-LAG3 de ratón a LAG3 humana y LAG3 de mono cynomolgus expresados en la superficie de células de ovario de hámster chino.

Los anticuerpos anti-LAG3 humana de ratón se probaron para determinar la unión a células CHO-K1 que expresaban LAG3 humana y LAG3 de cynomolgus usando un ELISA basado en células. Las células CHO-K1 se sembraron en placas como se describe anteriormente y se eliminó el medio antes de añadir las muestras de prueba. Los anticuerpo purificado de los clones LB145.22D2.E1.1D1 (22D2), LB148.19E8.G1.1A1 (19E8), LB148.4A10.1H1 (4A10) y LB148.11C9.1C1 (11C9) se diluyeron en serie en DMEM/F12, BCS al 10 % (medio CHOK1) y se añadieron a las placas con CHO-K1. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30-60 minutos y las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,05 % usando el programa de lavado celular en la lavadora Biotek como se describe anteriormente. La unión se detectó usando un anticuerpo secundario de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (Southern Biotech n.º de cat 1031-05) añadido a una dilución 1:2000 en medio CHO-K1 y se incubó a 37 °C durante 30-60 minutos. Las placas de ensayo se lavaron como anteriormente y se revelaron con TMB y se detuvieron con la solución de parada de TMB (KPL n.º de cat 50-85-06). Se determinó la absorbancia a 450 nm-620 nm. Las curvas de unión remuestrativas para la unión a células CHO-K1 transfectadas con LAG3 humana y de cynomolgus están en la figura 1.

Ejemplo 3. Determinación de la afinidad para la unión de anticuerpos anti-LAG3 de ratón a la proteína LAG3 humana recombinante.

La actividad de unión cinética de los clones LB148.19E8.G1.1A1 LB148.4A10.1H1, LB148.11C9.1C1 y LB145.22D2.E1.1D1 de anti-LAG3 humana de ratón, usando proteína recombinante etiquetada con LAG3-His humana se midió por resonancia de plasmón superficial usando un sistema Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Aproximadamente 4000 UR de fragmento gamma específico anti-Fc de IgG Fc de ratón de cabra, (Jackson ImmunoResearch número de catálogo 115-006-071, Lote 81313) se inmovilizó mediante química de acoplamiento de amina en un chip sensor CM4 Serie S, número de catálogo BR-1005-34. Los clones anti-LAG3 humana de ratón enumerados anteriormente se inyectaron sobre las superficies anti-ratón de cabra inmovilizadas a 1 µg/ml para un nivel de captura de 40 UR. Se usó HBS-EP+ tampón (BR-1006-69) como tampón de ejecución con un caudal de 30 µl/min.

Se inyectaron concentraciones variables de proteína LAG3-His humana que variaban desde 0,15 nM a 18,8 nM, a un caudal de 40 µl/min se inyectaron sobre las superficies de anticuerpo. Después de cada ciclo de inyección, la superficie del chip Serie S CM4 se regeneró usando una inyección de seis segundos de solución de glicina 10 mM pH 1,5 seguida de una inyección de solución de NaOH 12,5 mM a un caudal de 60 µl/min.

Se utilizaron sensorgramas de unión de sustracción de fondo para analizar la constante de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d), y la constante de disociación en equilibrio K_D . Los conjuntos de datos resultantes se ajustaron con un modelo de unión de Langmuir 1:1 utilizando el programa informático de evaluación Biacore T200 (versión 2.0). La Tabla 4 resume las afinidades de los anticuerpos de ratón anti-LAG3 humana por LAG3 humana recombinante.

45 **Tabla 4: Medición de la afinidad por anticuerpos anti-LAG3 humana de ratón con LAG3 humana recombinante.**

ID. del clon	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	K_D (M)
LB145.22D2.E1.1D1	1,39E+07	3,84E-05	2,77E-12
LB148.19E8.G1.1A1	7,43E+06	1,09E-04	1,47E-11
LB148.11C9.1C1	1,31E+06	1,92E-03	1,47E-09
LB148.4A10.1H1	1,25E+06	1,13E-04	9,03E-11

Asimismo, La unión de Ab6 a CD4 humano, que está estructuralmente relacionado con LAG3, teniendo ambos cuatro dominios extracelulares similares a Ig, no se detectó por BiaCore o por FACS cuando se expresó CD4 en células L transfectadas.

Ejemplo 4. Efecto de los anticuerpos anti-LAG3 sobre células de hibridoma de linfocitos T murinas 3A9 que expresan LAG3 humana.

La capacidad de los anticuerpos anti-LAG3 para potenciar la activación de linfocitos T específicos de antígeno se probó en una versión modificada de un ensayo de activación de linfocitos T descrito anteriormente (Workman *et al.*, (2002) Eur. J. Immunol. 32:2255-2263).

Se estimuló un hibridoma (3A9) de linfocitos T de ratón específicos del péptido HEL₄₈₋₆₃ con una línea de linfocitos B, de haplotipo coincidente, MHCII⁺ pulsada con péptido HEL₄₈₋₆₃ (LK35.2) y se evaluó la liberación de IL-2 como una

lectura para la activación de linfocitos T específicos de antígeno. La respuesta de los linfocitos T 3A9 a las células LK35.2 pulsadas con péptido HEL₄₈₋₆₃ era dependiente de la dosis.

Las líneas de linfocitos T 3A9 que sobreexpresan de forma estable LAG3 de ratón o humana se generaron mediante transducción retroviral. Se demostró que MHC2 de ratón en células LK35.2 puede unirse a LAG3 tanto humana como de ratón, dando como resultado una fuerte reducción de la producción de IL-2 específica de antígeno, a concentraciones de activación de linfocitos T subóptimas. El efecto máximo de la actividad de LAG3 se observó al titular el péptido HEL₄₈₋₆₃ a una concentración de 31,2 nM. El efecto inhibitorio de la sobreexpresión de LAG3 no se observó cuando se utilizaron linfocitos B LK35.2 pulsadas con dosis de péptido más altas (correspondientes a > 100 nM). Tratando con 10 ug/ml de un anticuerpo de LAG3 de ratón disponible comercialmente, C9B7W, se pudo rescatar IL-2 a niveles de las células del vector 3A9.

Para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-LAG3 en este ensayo, se trataron previamente linfocitos T 3A9 que sobreexpresaban LAG3 de ratón o humana (100.000 por pocillo) con anticuerpos anti-LAG3 (diluidos en serie en diluciones de 3 veces a partir de 10 ug/ml) durante 30 minutos a 37 °C, y se estimularon con células LK35.2 (33.333 por pocillo) pulsadas durante 30 minutos antes del cocultivo con péptido HEL₄₈₋₆₃ 31,2 nM. Después de la estimulación durante 24 h a 37 °C y CO₂ al 5,0 %, la secreción de IL-2 se evaluó en sobrenadantes de cultivo por mesoescala. La inhibición de LAG3 con un anticuerpo antagonista restauró la función de los linfocitos T dando como resultado el rescate de la producción de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. La producción de IL-2 no se rescató cuando las células 3A9 se trataron previamente con anticuerpos de control de isotipo. La capacidad de sobreexpresión de LAG3 para suprimir la secreción de IL-2 junto con el rescate de IL-2 después del tratamiento con anticuerpo anti-LAG3 valida este ensayo como una herramienta de detección consistente. La Tabla 5 enumera las CE50 para el rescate de IL-2 utilizando el sistema hLAG3-3A9 para los anticuerpos de ratón anti-LAG3 humana.

Tabla 5: Los anticuerpos de ratón anti-LAG3 humana estimulan la producción de IL-2 en el sistema de linfocitos T hLAG3-3A9

ID. del clon	CE50 (nM)	CE50 (nM)
LB145.22D2.E1.1D1	1,06	1,65
LB148.19E8.G1.1A1	1,74	1,83
LB148.11C9.1C1	3,56	4,06
LB148.4A10.1H1	2,83	2,96

Ejemplo 5. Bloqueo de la unión LAG3/MHC clase II en células Daudi.

Se probó la capacidad de los clones de ratón anti-LAG3 humana para bloquear la interacción de hLAG3 con MHC de clase II humana. Se usaron células Daudi (ATCC n.º CCL-213) como línea celular positiva para la expresión de MHC de clase II humana. Las células Daudi se bloquearon con 10 ug/ml de IgG de cabra en HBSS y BCS al 2 % en hielo durante 30 minutos y 0,5x10⁶ células/muestra se dividieron en alícuotas en una placa de fondo en V de 96 pocillos y se eliminó el tampón de bloqueo. Los clones LB145.22D2.E1.1D1, LB148.19E8.G1.1A1, LB148.4A10.1H1 y LB148.11C9.1C1 se diluyeron en serie a partir de 20 ug/ml en HBSS/BCS al 2 % y se incubaron previamente con 2 ug/ml de LAG3 humana-huFc en placas de fondo en U de polipropileno de 96 pocillos en un volumen final de 100 ul y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación previa, las mezclas de sobrenadante de LAG3-Fc humana/hibridoma se añadieron a las células Daudi bloqueadas y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1200 rpm y se lavaron dos veces con HBSS/BCS al 2 %. La unión de LAG3-Fc humana a células Daudi se detectó usando el conjugado F(ab)₂ de cabra anti-IgG humana-PE (Southern Biotech n.º de Cat) a una dilución 1:200 en un volumen de tinción de 100 ul y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces como se describe anteriormente, se resuspendieron en HBSS/BCS al 2 % y se leyeron en el FACSCalibur. La Tabla 6 resume las CI50 para el bloqueo de MHC de clase II para los clones de ratón anti-LAG3 humana.

Tabla 6: Los anticuerpos de ratón anti-LAG3 humana bloquean la interacción de MHC de clase II humana con la proteína recombinante LAG3-Fc humana.

ID. del clon	CI50 (nM)
LB145.22D2.E1.1D1	2,10
LB148.19E8.G1.1A1	2,80
LB148.11C9.1C1	2,00
LB148.4A10.1H1	1,90

Ejemplo 6. Evaluación de cuatro anticuerpos precursores anti-LAG3 humana para determinar la reactividad cruzada tisular en un conjunto focalizado de tejidos humanos normales por inmunohistoquímica.

Se tiñeron secciones congeladas de un subconjunto de tejidos humanos normales (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, hipófisis) usando cuatro clones de anticuerpos anti-LAG3 humana (LB148.4A10.1H1 (4A10), LB148.11C9.1C1 (11C9), LB148.19E8.G1.1A1 (19E8), LB145.22D2.E1.1D1 (22D2)) como reactivos inmunohistoquímicos, para explorar una posible reactividad tisular inesperada. La amígdala humana se utilizó como control de tinción positivo. Se ejecutaron IgG2a, IgG1 y IgG2b de ratón, en adelante, anticuerpos de "control de isotipo", de manera simultánea con los correspondientes clones de anti-LAG3 humana en todos los tejidos para servir como comparadores para la evaluación del marcado no específico.

La prueba de reactividad cruzada inmunohistoquímica de los anticuerpos 4A10, 11C9 y 19E8 y 22D2 se realizó en ejecuciones separadas.

Todos los portaobjetos se revisaron por un patólogo y la señal inmunohistoquímica se puntuó en una escala de 0-3 (0 = negativo, +1 = baja, +2 = moderada, +3 = alta). Se compararon las intensidades y patrones de tinción entre el artículo de prueba y los reactivos de control de isotipo. Se consideró que la tinción del artículo de prueba era significativa cuando la intensidad excedía sustancialmente la del control de isotipo o tenía una diferencia distinta, reproducible en el patrón de distribución dentro del tejido.

Tabla 7. Clon 4A10 de Lag3 (5 ug/ml)

Anticuerpo n.º de portaobjetos	Identificación de tejidos (humanos)	Prueba de anticuerpos	Isotipo IgG2a
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D6414 B1 cerebro	+1	+1
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D1106 B1 corazón	+1	+1
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D7462 B1 riñón	+1	+1
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D7122 B 1 hígado	+2	+2
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D7092 B1 pulmón	+1	+1
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D5425 B1 páncreas	+2, células exocrinas	0
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D5745 B1 hipófisis	+1	+1
Control positivo			
clon 4A105 de Lag3 ug/ml	D7530 B2 amígdalas	+2 (marcado apropiado)	+1
El marcado positivo de las células exocrinas pancreáticas (aproximadamente el 20 % de la población total presente) solamente se observa en la muestra tratada con el anticuerpo de prueba, pero se limita al citoplasma.			

Tabla 8. clon 11C9 de Lag3

(10ug/ml)			
Anticuerpo n.º de portaobjetos	Identificación de tejidos (humanos)	Prueba de anticuerpos	Isotipo IgG1
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D6414 B1 cerebro	+1	+1
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D1106 B1 corazón	0	0
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D7462 B1 riñón	0	0
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D7122 B 1 hígado	+1	+2
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D7092 B1 pulmón	0	0
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D5425 B1 páncreas	0	0
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D5745 B1 hipófisis	0	0

(continuación)

Control positivo			
Clon 11C9 de Lag3 10 ug/ml	D7530 B2 amígdalas	+2 (marcado apropiado)	0
Todas las señales positivas citadas en las tablas (excepto en los controles positivos) se interpretan como artefactos asociados con el procedimiento realizado y son idénticas o más fuertes en el control de isotipo.			

Tabla 9. clon 19E8 de Lag3

(0,5 ug/ml)			
Anticuerpo n.º de portaobjetos	Identificación de tejidos (humanos)	Prueba de anticuerpos	Isotipo IgG2b
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D6414 B1 cerebro	+1 (músculo liso vascular)	0
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D1106 B1 corazón	+1 (músculo liso vascular)	0
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D7462 B1 riñón	+1 (músculo liso vascular)	+1
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D7122 B 1 hígado	+1 (músculo liso vascular)	+1
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D7092 B1 pulmón	0	+1
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D5425 B1 páncreas	+1 (músculo liso vascular)	0
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D5745 B1 hipófisis	+1 (músculo liso vascular)	0
Control positivo			
Clon 19E8 de Lag3 0,5 ug/ml	D7530 B2 amígdalas	+3 (marcado apropiado)	+1
El marcado inespecífico del músculo liso vascular solamente se observa en las muestras tratadas con anticuerpos de prueba, pero se limita al sarcoplasma/citoplasma.			

Tabla 10. clon 22D2 de Lag3

(10 ug/ml)			
Anticuerpo	Identificación de tejidos (humanos)	Prueba de anticuerpos	Isotipo IgG2a
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D6414 B1 cerebro	+2	+2
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D1106 B1 corazón	+1	+1
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D7462 B1 riñón	+2	+2
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D7122 B 1 hígado	+1	+2
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D7092 B1 pulmón	+2	+2
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D5425 B1 páncreas	+1	+1
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D5745 B1 hipófisis	+2	+2
Control positivo			
Clon 22D2 de Lag3 10 ug/ml	D7530 B2 amígdalas	+3 (marcado apropiado)	+2
Todas las señales positivas citadas en las tablas (excepto en los controles positivos) se interpretan como artefactos asociados con el procedimiento realizado y son idénticas o más fuertes en el control de isotipo.			

5

En conclusión, el clon 19E8 mostró marcado sarcoplásmico relativamente prominente del músculo liso vascular en todos los tejidos examinados excepto en el pulmón. El clon 4A10 mostró reactividad inmunohistoquímica citoplasmática en aproximadamente el 20 % de las células glandulares exocrinas pancreáticas. Los clones 11C9 y 22D2 no demostraron ningún marcado más allá del observado con el control de isotipo.

10

Ejemplo 7: Unión de clones de Lag3 a linfocitos T aisladas de sangre humana y de monos cynomolgus.

Se evaluó la unión de clones de mAb de Lag3 a linfocitos T primarios utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humanas y de mono cynomolgus (cyno). Se obtuvo sangre humana de los donantes locales; la sangre de cyno se obtuvo de Bioreclamation. Se aislaron PBMC de la sangre completa usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, n.º de Cat 17-1440-03) a 524 xg durante 40 minutos. Se recogieron PBMC de la interfaz medio:plasma y se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los glóbulos rojos residuales se lisaron usando una solución de lisis de glóbulos rojos de cloruro de amonio-potasio (ACK, GIBCO, n.º de cat. A10492-010). Las PBMC de mono cynomolgus o humanas (3×10^6 /ml) se estimularon con 4 µg/ml de PHA (Sigma, L2769) durante 48 h y 20 h, respectivamente. Para el análisis por citometría de flujo, se utilizaron 1×10^6 PBMC activadas con PHA por tinción en 50 µl de tampón de tinción FACS (BD, n.º de cat. 554657). Se incubaron clones de mAb Lag3 o los controles de isotipo correspondientes (Tabla 11) con PBMC humanas o de cyno seguido de detección usando anti-IgG de ratón de cabra-PE (BD 550589). Se utilizaron como marcadores fenotípicos anti-CD3 humana de ratón-azul pacífico (BD 558124, clon SP34-2), anti-CD4 humana de ratón-PerCP (BD 550631, clon L200) y anti-CD8 humana de ratón-APC-Cy7 (BD 557834, clon SKI). La adquisición de la muestra se realizó en un citómetro de flujo LSR II y los datos se analizaron utilizando el programa informático FlowJo versión 10.0.6 (Tree Star, Inc.).

El análisis por citometría de flujo reveló la unión de todos los clones de Lag3 analizados a linfocitos T humanos y de cyno primarios (datos representativos mostrados en la figura 2).

Tabla 11: Clones de Lag 3 y controles de isotipo utilizados en el estudio

TC31.3E1.C7	28ACM	mlgG2a/K	Fosfato de Na 10 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 3 %, pH7,3
TC31.27F11.C2	64AFW	mlgG1/K	Fosfato 10 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 3 %, pH7,4
KM9.LP1.MAB3	63ADP	mlgG2b/K	Acetato de sodio 20 mM, sacarosa al 7 %, pH5.5
Lag3 propia	n.º de lote	isotipo	formulación
LB148.19E8.G1.1A1	42AGF	mlgG2b/K	PO4 10 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 3 %, pH 7,4
LB145.22D2.E1.1D1	98AGF	mlgG2a/K	PO4 10 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 3 %, pH 7,4
LB148.4A10.1H1	45AGF	mlgG2a/K	PO4 10 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 3 %, pH 7,4
LB148.11C9.1C1	47AGF	mlgG1/K	NaAc 20 mM, sacarosa al 9 %, pH 5,0

Ejemplo 8: Mapeo de epítomos de anticuerpos de hLAG3 mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno deuterio.

Los contactos entre los anticuerpos anti-LAG3 y LAG3 humana se determinaron mediante el uso de análisis de espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno deuterio.

Materiales

- LAG3 -His humana: [Líder de VEGF] -LAG3_H- [His9G]

```
(LQPGAIEVPVWAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHAPAPSSWGPRP
RRTVLSVGPGLRSLRPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS
MTASPPGSLRASDWILNCSFSRPDRPASVHWFNRNGQGRVPVRESPPHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILT
YRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSLTAKWTPPGGGPDLLVTGNDGFTL
RLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTLAIITVTPKSFSGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRS
FSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAYVFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLHHHHHHHHHGGQ)
```

- (SEQ ID NO: 447)
- Clon 22D2 anti-hLAG3 (anticuerpo quimérico que comprende el [LAG3_H] mAb (LB145.22D2.E1.D1 (VH0/VL0) Genentech) IgG4 S228P/kappa (PX) y la región marco de IgG4 humana que contiene la mutación S228P estabilizadora de la bisagra)
- Clon 11C9 anti-hLAG3 (ratón x [LAG3_H] mAb (LB148.11C9.1C1) IgG1/kappa (HY)/IgG1 de ratón)
- Clon 4A10 anti-hLAG3 (ratón x [LAG3_H] mAb (LB148.4A10.1H1) IgG2a/kappa (HY)/IgG2a de ratón)

Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas

El espectrómetro de masas era un Orbitrap-Velos de Thermo Scientific. Para la medición de muestras marcadas con deuterio, el espectrómetro de masas se configuró para adquirir un barrido completo de datos de MS en la trampa orbital a una potencia de resolución de 60.000, un recuento de iones diana de 1E6 y un tiempo máximo de inyección de iones de 500 milisegundos. Para la adquisición de datos MS/MS para identificaciones de péptidos, el espectrómetro de masas se configuró para adquirir un espectro de barrido completo a un poder de resolución de 60.000 seguido de diez espectros MS/MS dependientes de datos en la trampa de iones.

El sistema de cromatografía líquida fue un Waters nanoAcquity para el gradiente de columna analítica y una bomba isocrática Waters 515 para la digestión y carga de muestras. Para la digestión y carga de muestras, el tampón utilizado fue acetonitrilo al 2 % y ácido trifluoroacético al 0,05% a un caudal de 80 ul/min. Para el gradiente analítico, los tampones fueron tampón A) ácido fórmico al 0,1 % en agua y tampón B) ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

El gradiente fue de 40 ul/min desde B al 2 % hasta B al 36 % en 10 minutos, seguido de un lavado de B al 80 % durante 1,5 minutos y un reequilibrio a B al 2 % durante 3 minutos. Después, la columna se lavó ciclando el gradiente de B entre 2 % y 80 %, tres veces con 1 minuto en cada etapa, seguido de un equilibrado final de B al 2 % durante 5 minutos. La columna de captura era una columna de protección Waters Vanguard C18 BEH de 1,7 um y la columna analítica era una columna Waters C18 BEH300, 1,7 um 1x50 mm.

La manipulación de la muestra para el marcado con deuterio se realizó mediante un sistema Leaptec H/D-X PAL. La bandeja de muestras de marcado se ajustó a una temperatura de 25 °C, la bandeja de desactivación se fijó a 1,5 °C y la trampa y la cámara de la columna analítica se fijaron a 1,5 °C. La columna de pepsina inmovilizada (Porosyme Immobilized Pepsin 2,1 x 30 mm, Life Technologies) se mantuvo fuera de la cámara de la columna a temperatura ambiente.

Marcado con deuterio

Para los clones de anticuerpos 22D2 y 11C9, hLAG3-His (113 pmol/ul) se mezcló con un volumen igual del anticuerpo (55 pmol/ul) o, como el control sin unir, PBS pH 7,6. Las muestras unidas al anticuerpo y el control sin unir se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de comenzar el experimento de marcado. Para 4A10, el anticuerpo (30 pmol/ul) se mezcló con hLAG3-His en una relación 2:1 v/v. Las etapas posteriores fueron idénticas para todas las muestras.

Para marcar las muestras con deuterio, se mezclaron 2 ul de muestra con 25 ul de PBS en óxido de deuterio pD 7,6. Los puntos temporales de marcado fueron 30, 300, 3000 o 9000 segundos. Después del tiempo expuesto, se añadieron 25 ul de la mezcla de marcado a 40 ul de tampón de desactivación frío (urea 8M, TCEP 100 mM, dodecilmaltósido al 0,02 %). La muestra desactivada se incubó a 1,5 °C durante 2 minutos. A continuación, se inyectaron 55 ul en la cámara de enfriamiento de la columna donde la muestra se pasó sobre la columna de pepsina y los péptidos resultantes se cargaron en la columna de captura. Después de tres minutos, se pusieron en marcha el gradiente analítico y el espectrómetro de masas.

Se generó una muestra completamente deuterada incubando 2 ul de hLAG3 con 108 ul de tampón desnaturizante deuterado (urea 4 M, TCEP 100 mM, 0,01 % de DDM en 99,5 % de óxido de deuterio). La muestra se incubó a 37 °C durante la noche. A continuación, se inyectaron directamente 55 ul en la cámara de la columna y se adquirieron los datos como antes.

Análisis de datos

Los datos de LC-MS/MS se adquirieron de una muestra sin marcar y se buscaron antes del marcado con deuterio para verificar la digestión satisfactoria de las proteínas y generar una lista de péptidos. Los datos se buscaron en bases de datos utilizando Proteome Discoverer 1.4 y el algoritmo de búsqueda SEQUEST HT (ThermoFisher Scientific). La base de datos de proteínas utilizada fue la secuencia de LAG3 humana-His concatenada a la base de datos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los datos de MS del experimento de marcado con deuterio se procesaron por HDExaminer (Sierra Analytics). La masa y el tiempo de retención seleccionados por el programa informático para cada péptido se verificaron manualmente.

Resultados

Los restos de LAG3 humana protegidos por los anticuerpos 22D2, 4A10 y 11C9, cuando se une a la proteína LAG3, se ilustran en las figuras 3, 4 (a-c) y 5 (a-b).

Ejemplo 9: KinExA basado en células

Las afinidades de los anticuerpos de LAG3 por LAG3 se determinaron usando un ensayo de exclusión cinética (KinExA, por sus siglas en inglés) basado en células. KinExA basado en células se puede utilizar para medir la afinidad de una molécula por un compañero de unión en la superficie de una célula (Rathanaswami *et al.* Analytical Biochemistry 373(1): 52-60 (2008); Xie *et al.* J. Immunol. Methods 304 (1-2): 1-14 (2005)). En este caso, Las células BaF/3 se transfectaron de forma estable con proteínas LAG3 humana y de mono cynomolgus. Las células transfectadas o la línea celular de control BaF/3 precursora se cultivaron hasta una densidad de $1,7 \times 10^6$ hasta $3,2 \times 10^6$ células por ml a 37 °C, en medios 120 RPM, CO₂ al 5 %, IX RPMI 1640 con FBS al 10 %, 10 ng/ml de IL-3, 5 µg/ml de puomicina. Las células se concentraron, se mezclaron con anticuerpo 15 pM o 150 pM en medio de cultivo celular y se incubaron de 24 a 48 horas a temperatura ambiente mientras se rotaba de 20 a 30 RPM. Las células estaban presentes en una concentración máxima de 2×10^7 células por ml (BaF/3 precursoras o transfectantes con LAG3 de cynomolgus) o 1×10^7 células por ml (transfectantes con LAG3 humana) y se diluyeron en 2 veces, serie de 18 miembros. Las células se sedimentaron y se midió el anticuerpo libre en el sobrenadante usando un instrumento KinExA 3200 (Sapidyne, Idaho, Estados Unidos). El instrumento unió el anticuerpo libre a perlas de polimetilmetacrilato (Sapidyne) que se habían recubierto con F(ab')₂ de cabra anti-Fcγ humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pensilvania, Estados Unidos). El anticuerpo de las perlas se marcó con 1,5 µg/ml de anti-(Fab')₂ humano de cabra conjugado con Alexa Fluor® 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), se lavó y se leyó la señal fluorescente utilizando el KinExA™ 3200. Los datos de las concentraciones de 15 pM y 150 pM de cada anticuerpo se ajustaron simultáneamente usando el programa informático de análisis de la curva n KinExA™ pro versión 4.0.11 (Sapidyne).

Tabla 12. Medidas de afinidad de KinExA.

	K _D de LAG3 humana		K _D de LAG3 de cynomolgus	
	K _D (pM)	n	K _D (pM)	n
22D2 Quimera	3	2	11	2
Hu22D2 VH6/VL3 (Ab 5)	6	2	25	2
Hu22D2 VH6/VL3 N55S (Ab 7)	10	2	11	2
Hu22D2 VH6/VL3 N55Q (Ab 8)	11	2	16	2
Hu22D2 VH6/VL3 N55D (Ab 6)	2	3	12	3

Ejemplo 10. Efecto de los anticuerpos anti-LAG3 sobre células de hibridoma de linfocitos T murinas 3A9 que expresan LAG3 humana.

La capacidad de los anticuerpos anti-LAG3 para potenciar la activación de linfocitos T específicos de antígeno se probó en una versión modificada de un ensayo de activación de linfocitos T descrito anteriormente (Workman *et al.*, Eur. J. Immunol. 32:2255-2263 (2002)).

Se estimuló un hibridoma (3A9) de linfocitos T de ratón específicos del péptido HEL₄₈₋₆₃ con una línea de linfocitos B, de haplotipo coincidente, MHCII⁺ pulsada con péptido HEL₄₈₋₆₃ (LK35.2) y se evaluó la liberación de IL-2 como una lectura para la activación de linfocitos T específicos de antígeno. La respuesta de los linfocitos T 3A9 a las células LK35.2 pulsadas con péptido HEL₄₈₋₆₃ era dependiente de la dosis.

Las líneas de linfocitos T 3A9 que sobreexpresan de forma estable LAG3 de ratón o humana se generaron mediante transducción retroviral. Se demostró que MHC2 de ratón en células LK35.2 puede unirse a LAG3 tanto humana como de ratón, dando como resultado una fuerte reducción de la producción de IL-2 específica de antígeno, a concentraciones de activación de linfocitos T subóptimas. El efecto máximo de la actividad de LAG3 se observó al titular el péptido HEL₄₈₋₆₃ a una concentración de 31,2 nM. El efecto inhibitorio de la sobreexpresión de LAG3 no se observó cuando se utilizaron linfocitos B LK35.2 pulsadas con dosis de péptido más altas (correspondientes a > 100 nM). Tratando con 10 ug/ml de un anticuerpo de LAG3 de ratón disponible comercialmente, C9B7W, Los niveles de IL-2 se rescataron a los de las células del vector 3A9.

Para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-LAG3 en este ensayo, se trataron previamente linfocitos T 3A9 que sobreexpresaban LAG3 de ratón o humana (100.000 por pocillo) con anticuerpos anti-LAG3 (diluidos en serie en diluciones de 3 veces a partir de 10 ug/ml) durante 30 minutos a 37 °C, y se estimularon con células LK35.2 (33.333 por pocillo) pulsadas durante 30 minutos antes del cocultivo con péptido HEL₄₈₋₆₃ 31,2 nM. Después de la estimulación durante 24 h a 37 °C y CO₂ al 5,0 %, la secreción de IL-2 se evaluó en sobrenadantes de cultivo por mesoescala. La inhibición de LAG3 con un anticuerpo antagonista restauró la función de los linfocitos T dando como resultado el rescate de la producción de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. La producción de IL-2 no se rescató cuando las células 3A9 se trataron previamente con anticuerpos de control de isotipo. La capacidad de sobreexpresión de LAG3 para suprimir la secreción de IL-2 junto con el rescate de IL-2 después del tratamiento con anticuerpo anti-LAG3 validó este ensayo como una herramienta de detección consistente. La Tabla 13 enumera las CE₅₀ para el rescate de IL-2 utilizando el sistema hLAG3-3A9 para los anticuerpos anti-LAG3 humana y anti-LAG3 humanizados de ratón.

Tabla 13: Los anticuerpos de ratón anti-LAG3 humana estimulan la producción de IL-2 en el sistema de linfocitos T hLAG3-3A9

Anticuerpo	Intervalo de CE ₅₀ , nM (n)
LB145.22D2.E1.1D1	1,06-1,65 (2)
LB148.19E8.G1.1A1	1,74-1,83 (2)
LB148.11C9.1C1	3,56-4,06 (2)
LB148.4A10.1H1	2,83-2,96 (2)
22D2 quimera	0,69-1,91 (5)
Hu22D2 VH6/VL3 (Ab 5)	0,57-1,07 (6)
Hu22D2 VH6/VL3 N55S (Ab 7)	0,45-1,27 (6)
Hu22D2 VH6/VL3 N55D (Ab 6)	0,47-1,01 (6)
Hu22D2 VH6/VL3 N55Q (Ab 8)	0,72-1,08 (6)

Ejemplo 11: Bloqueo de la unión LAG3/MHC clase II en células Daudi.

Se probó la capacidad de los clones de ratón anti-LAG3 humana y anti-LAG3 humanizados para bloquear la interacción de hLAG3 con MHC de clase II humana. Se usaron células Daudi (ATCC n.º CCL-213) como línea celular positiva para la expresión de MHC de clase II humana. Las células Daudi se bloquearon con 10 ug/ml de IgG de cabra en HBSS y BCS al 2 % en hielo durante 30 minutos y 0,5x10⁶ células/muestra se dividieron en alícuotas en una placa de fondo en V de 96 pocillos y se eliminó el tampón de bloqueo. Los clones LB145.22D2.E1.1D1, LB148.19E8.G1.1A1, LB148.4A10.1H1 y LB148.11C9.1C1 y hu22D2 VH6/VL3, hu22D2 VH6/VL3 N55Q, hu22D2 VH6/VL3 N55S, hu22D2 VH6/ VL3 N55D y 22D2 quimérico se diluyeron en serie a partir de 20 ug/ml en HBSS/BCS al 2 % y se incubaron previamente con 2 ug/ml de LAG3 humana-huFc o LAG3-huFc biotinilada humana en placas de fondo en U de

polipropileno de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ l y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación previa, las mezclas de LAG3-Fc humana/anticuerpo se añadieron a las células Daudi bloqueadas y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1200 rpm y se lavaron dos veces con HBSS/BCS al 2 %. La unión de LAG3-Fc humana a células Daudi se detectó usando conjugado F(ab')₂ conjugado de cabra anti-IgG humana-PE (Southern Biotech n.º de Cat) a 1:200 para huLAG3-huFc no conjugada o dilución 1:500 de estreptavidina-PE para huLAG3-huFc biotinilada en un volumen de tinción de 100 μ l y se incubó en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces como se describe anteriormente, se resuspendieron en HBSS/BCS al 2 % y se leyeron en el FACSCalibur. La Tabla 14 resume las CI50 para el bloqueo de MHC de clase II para los clones de ratón anti-LAG3 humana.

Los anticuerpos anti-LAG3 humana humanizados (VH6/VL3, VH6/VL3 N55D, VH6/VL3 N55Q, VH6/VL3 N55S y 22D2 quimérico) se probaron para determinar su capacidad para bloquear la interacción de hLAG3 con MHC de clase II humana como se describe anteriormente. Se usó LAG3-huFc humana biotinilada y la detección se realizó usando estreptavidina-PE.

Tabla 14: Los anticuerpos de ratón anti-LAG3 humana bloquean la interacción de MHC de clase II humana con la proteína recombinante LAG3-Fc humana.

Anticuerpo	CI50 (nM)
LB145.22D2.E1.1D1	2,1
LB148.19E8.G1.1A1	2,8
LB148.11C9.1C1	2,0
LB148.4A10.1H1	1,9
22D2 quimérico	2,5
Hu22D2 VH6/VL3 (Ab 5)	2,6
Hu22D2 VH6/VL3 N55S (Ab 7)	2,1
Hu22D2 VH6/VL3 N55D (Ab 6)	2,4
Hu22D2 VH6/VL3 N55Q (Ab 8)	2,5

Ejemplo 12: Unión de clones de Lag3 a linfocitos T aisladas de sangre humana y de monos cynomolgus.

Se evaluó la unión de clones de mAb de LAG-3 a linfocitos T primarios utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas y de mono cynomolgus (cyno). Se obtuvo sangre humana de los donantes locales; la sangre de cyno se obtuvo de Bioreclamation. Se aislaron PBMC de la sangre completa usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, n.º de Cat 17-1440-03) a 524 xg durante 40 minutos. Se recogieron PBMC de la interfaz medio:plasma y se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los glóbulos rojos residuales se lisaron usando una solución de lisis de glóbulos rojos de cloruro de amonio-potasio (ACK, GIBCO, n.º de cat. A10492-010). Las PBMC de mono cynomolgus o humanas (3 x10⁶/ ml) se estimularon con 4 μ g/ml de PHA (Sigma, L2769) durante 48 h y 20 h, respectivamente. Para el análisis por citometría de flujo, se utilizaron 1x10⁶ PBMC activadas con PHA por tinción en 50 μ l de tampón de tinción FACS (BD, n.º de cat. 554657). Se incubaron clones de mAb LAG-3 o los controles de isotipo correspondientes con PBMS humanas o de cyno seguido de detección usando anti-IgG de ratón de cabra-PE (BD 550589). Se utilizaron como marcadores fenotípicos anti-CD3 humana de ratón-azul pacífico (BD 558124, clon SP34-2), anti-CD4 humana de ratón-PerCP (BD 550631, clon L200) y anti-CD8 humana de ratón-APC-Cy7 (BD 557834, clon SKI). La adquisición de la muestra se realizó en un citómetro de flujo LSR II y los datos se analizaron utilizando el programa informático FlowJo versión 10.0.6 (Tree Star, Inc.).

El análisis por citometría de flujo reveló la unión de todos los anticuerpos anti-LAG3 analizados a linfocitos T humanas y de cyno primarios. Se determinaron las CE₅₀ para la unión a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ humanos y de cynomolgus para los anticuerpos 22D2 humanizados y se resumen en la Tabla 15. Los datos representan 3 donantes humanos y 3 de cynomolgus después de la estimulación con 4 μ g/ml de PHA durante 40 horas antes de la tinción.

Tabla 15. CE₅₀ para la unión a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ humanos y de cynomolgus.

	(CE ₅₀ , pM)			
	LAG-3 humana		LAG-3 de cynomolgus	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Hu22D2 VH6/VL3 N55S (Ab 7)	57	49	35	41
Hu22D2 VH6/VL3 N55D (Ab 6)	39	33	30	30
Hu22D2 VH6/VL3 N55Q (Ab 8)	41	35	27	31

Ejemplo 13: Efecto del tratamiento con anticuerpo anti-LAG-3 humana+/- tratamiento anti-PD-1 sobre la producción de IL-2 en PBMC humanas estimuladas con SEB.

Ensayos de linfocitos T primarios humanos: el primer ensayo probó la función de bloquear LAG3 sola o en combinación con anti-PD-1 para aumentar la producción de IL-2 por los linfocitos T después de la activación con SEB de PBMC humanas (figura 7). La neutralización de la actividad de LAG3, sola y en presencia de anti-PD-1, dio como resultado una producción potenciada de IL-2. Se muestran ejemplos de los recuentos a mesoescala de IL-2 de 2 donantes en

una titulación de dosis de anticuerpo anti-LAG3. Hu22D2 potenció la producción de IL-2 por PBMC estimuladas con SEB en 1,54 veces (intervalo 1,15-2,36 veces, $n = 8$) en comparación con el control de isotipo y en combinación con anti-PD1 en 1,45 veces (intervalo 1,15-2,36 veces, $n = 4$ a 10 o 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de anti-PD-1) en comparación con anti-PD-1 solo más control de isotipo. Hu22D2 solo o en combinación con anti-PD-1, mostró una actividad comparable a un anticuerpo anti-LAG3 de referencia. Hu2D2 es Ab6. α -PD-1 es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano anti-PD1 humana. El anti-LAG3 de referencia es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano anti-LAG3 humana que se une al bucle adicional de LAG3 humana.

Ejemplo 14: Efecto del tratamiento con hu22D2+/- tratamiento anti-PD-1 sobre la producción de IFN-gamma y TNF α en PBMC humanas estimuladas con MLR.

También se utilizó un sistema MLR para probar la actividad de hu22D2 en linfocitos T primarios. Las PBMC humanas se estimulan con células dendríticas derivadas de monocitos de un donante diferente, que conduce a la activación de los linfocitos T debido al desapareamiento con MHC. En este ensayo se observó un alto grado de variabilidad en las respuestas de los donantes. Sin embargo, los datos preliminares demostraron que la neutralización de la actividad de LAG3, sola y en presencia de anti-PD-1 potenció la activación de los linfocitos T en dos de cada tres donantes, según lo evaluado por la producción de IFN- γ y TNF- α (figura 8). Hu2D2 es Ab6.

Ejemplo 15: Análisis farmacocinético y farmacodinámico de anti-LAG3 en monos cynomolgus.

Se evaluó el perfil farmacocinético y farmacodinámico de Ab6 en monos cynomolgus. Se revisaron y aprobaron los procedimientos relacionados con el cuidado y uso de animales en el estudio. Durante el estudio, el cuidado y uso de animales se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en la guía de la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC), la Ley de Bienestar Animal, el Panel sobre eutanasia de la American Veterinary Medical Association (AVMA) Euthanasia y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Institute for Laboratory Animal Research (ILAR).

Se utilizaron 25 monos cynomolgus macho sin tratamiento previo de origen chino (4,0 - 7,0 kg en el momento de la dosificación). Los animales se observaron dos veces al día. Adicionalmente, se observaron los animales en cada momento de recogida de sangre. Los pesos corporales se registraron una vez antes de cada dosis.

En el estudio, se asignaron cinco machos a cada uno de los 5 grupos. A los animales de todos los grupos se les administraron 5 dosis de artículos de prueba o control por vía IV a través de una vena cefálica durante 10 minutos. Las dosis para los grupos fueron de 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg. Se extrajeron muestras farmacocinéticas para todos los animales el día 1: antes de la dosis y 15 minutos y 1, 4, 8, 24 (Día 2), 48 (día 3) y 96 (día 5) horas después de la dosis. También se recogieron muestras el día 8: antes de la dosis y 1, 8, 24 (día 9), 48, (día 10), 120 (día 13) y 168 (día 15) horas después de la dosis. Todas las muestras se procesaron en plasma, se almacenaron congeladas a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Se extrajeron muestras farmacodinámicas para todos los animales el día 1: antes de la dosis y 15 minutos y 1, 4, 8, 24 (Día 2), 48 (día 3) y 96 (día 5) horas después de la dosis. También se recogieron muestras el día 8: antes de la dosis y 1, 8, 24 (día 9), 48 (día 10), 120 (día 13) y 168 (día 15) horas después de la dosis. Todas las muestras se procesaron en plasma, se almacenaron congeladas a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

El anticuerpo total y libre (anticuerpo no unido y parcialmente unido) se evaluaron mediante dos ensayos diferentes, ensayo universal y ensayo de captura de antígeno, respectivamente. Los datos de estas evaluaciones se exponen en la figura 9 (resultados del ensayo de captura de Ag) y en la figura 10 (resultados del ensayo universal). El aclaramiento y el volumen de distribución en estado estacionario para cada nivel de dosis se estimaron y tabularon en las tablas 16 (ensayo de captura de antígeno) y 17 (ensayo universal). Las diferencias entre el aclaramiento del anticuerpo y los parámetros de volumen de distribución demostraron que una porción del anticuerpo Ab6 estaba uniéndose a su diana en los sujetos de mono cynomolgus.

Tabla 16. Ensayo de captura de antígeno LAG3: aclaramiento de Ab6 y volumen de distribución en estado estacionario (Vss) a varias dosis.

Dosis (mg/kg)	Aclaramiento (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)
0,03	6,8	76,4
0,3	0,48	75,5
1	0,45	95,3
10	0,33	72,3
30	0,29	63,6

Los datos de captura de antígeno detectaron anticuerpo libre en la muestra. Estos datos de captura de antígeno (datos no mostrados) demostraron una diferencia de 23 veces en el aclaramiento en el intervalo de dosis investigado (0,003 mg/kg - 30 mg/kg) (tabla 16).

Tabla 17. Ensayo de anticuerpos totales: aclaramiento de Ab6 y volumen de distribución en estado estacionario (Vss) a varias dosis.

Dosis (mg/kg)	Aclaramiento (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)
0,03	0,94	47
0,3	0,36	48,9
1	0,33	56,1
10	0,26	60,9
30	0,26	66,5

- 5 Los datos de anticuerpos totales detectaron anticuerpo total en la muestra. Estos datos de anticuerpos totales (figura 9) demostraron una diferencia de 3,6 veces en el aclaramiento en el intervalo de dosis investigado (0,003 mg/kg - 30 mg/kg) (tabla 17).
- 10 Se evaluó la concentración total de Ab6 en monos cinolmorgous a las dosis de 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg a lo largo del tiempo. Los datos de esta evaluación se exponene en la figura 10. A medida que aumentaba la dosis, el aclaramiento del anticuerpo de los sujetos disminuyó. Los datos de concentración normalizados por la dosis de Ab6 a lo largo del tiempo se exponen en la figura 11. En puntos temporales posteriores, después de la segunda administración en bolo IV de Ab6, hubo una pérdida de exposición que indica una posible inmunogenicidad contra el anticuerpo.
- 15 Se observó el aclaramiento mediado por la diana LAG3 del anticuerpo Ab6 cuando la concentración del anticuerpo en los sujetos de mono se observaba a lo largo del tiempo. Se desarrolló un modelo PK de dos compartimentos con parámetros de aclaramiento lineales y no lineales ($V_{\text{máx}}$, K_m) para describir los perfiles de concentración-tiempo para Ab6. Estos datos se muestran en la figura 12.
- 20 El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas, diversas modificaciones de la invención, además de las que se describen en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 humana y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-131 del SEQ ID NO: 126 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulinas y dos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126, y cada cadena pesada de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116 y una región constante de IgG4 humana.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación S228P de acuerdo con el sistema UE.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulinas y dos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y cada cadena pesada de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, que consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulinas y dos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y cada cadena pesada de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 116.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, que consiste en dos cadenas ligeras de inmunoglobulinas y dos cadenas pesadas de inmunoglobulinas, en donde cada cadena ligera de inmunoglobulina consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-238 del SEQ ID NO: 126 y cada cadena pesada de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 1-119 del SEQ ID NO: 116.
8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que se expresa a partir de una célula de ovario de hámster chino.
9. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que está glicosilado con uno o más de los N-glicanos unidos a CHO que son G0-F, G1 -F, G2-F, G0, G1, G2 o Man5.
10. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende además un anticuerpo anti-PD-1.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab.
13. Un dispositivo de inyección que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 10-12.
14. Un polinucleótido que codifica: el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada o la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada de inmunoglobulina de los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
15. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 14.
16. Una célula hospedadora que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el polinucleótido de la reivindicación 14 o el vector de la reivindicación 15.
17. Un método de producción de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende:
 - a. cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo, o un dominio variable de cadena ligera

y un dominio variable de cadena pesada del fragmento de unión a antígeno en un medio de cultivo en condiciones favorables para la expresión del polinucleótido; y
b. opcionalmente, recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la célula hospedadora y/o del medio de cultivo.

- 5 18. El método de la reivindicación 17, en donde la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino.
- 10 19. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a LAG3 humana que es el producto del método de las reivindicaciones 17 o 18.
- 20 20. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
- 15 21. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para su uso en el tratamiento de cáncer.

20

25

30

35

40

45

50

55 **Nota:**

El documento completo que incluye las tablas de referencia y el listado de secuencias se puede descargar de la página web de la EPO (<https://register.epo.org>)

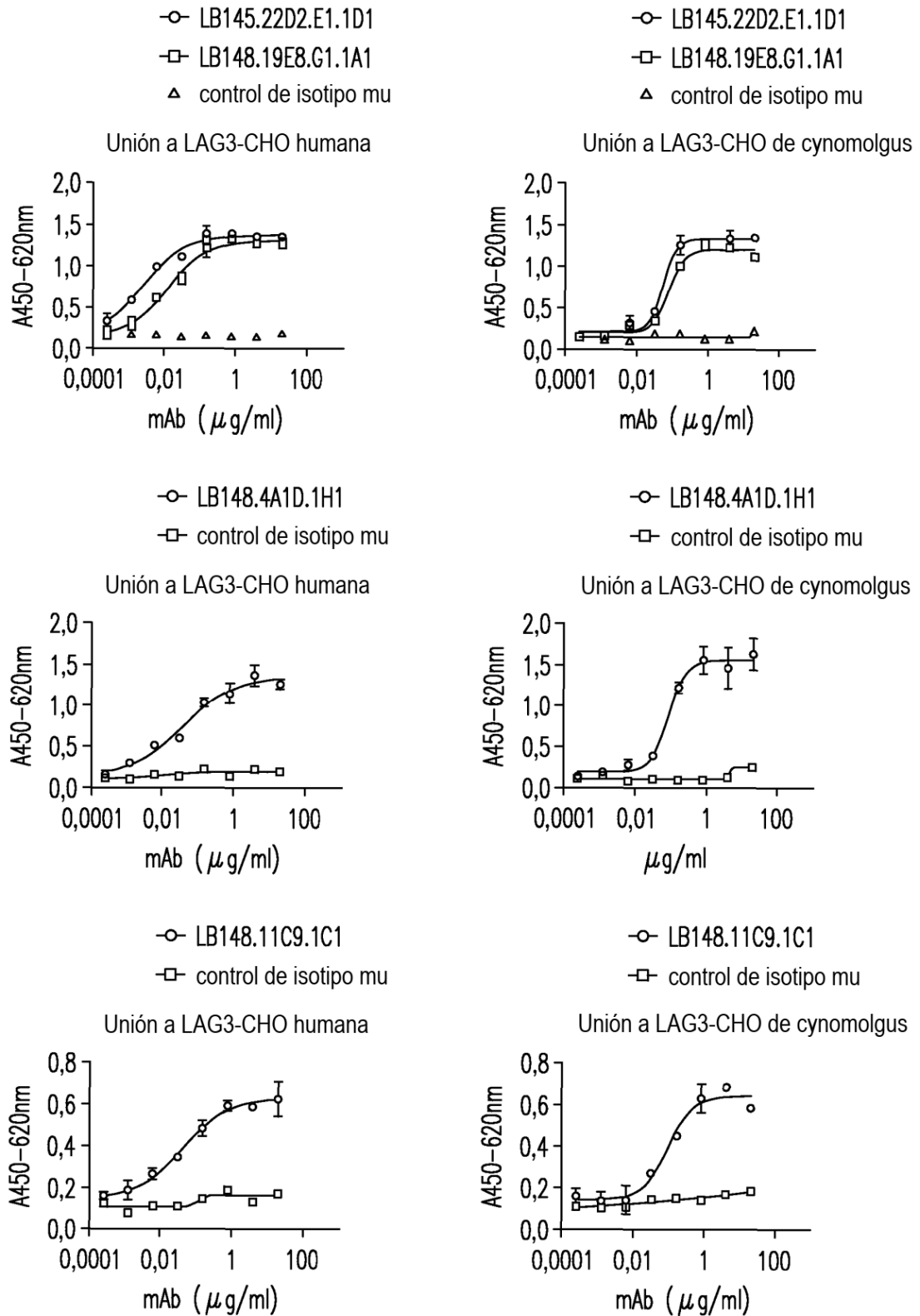


FIG.1

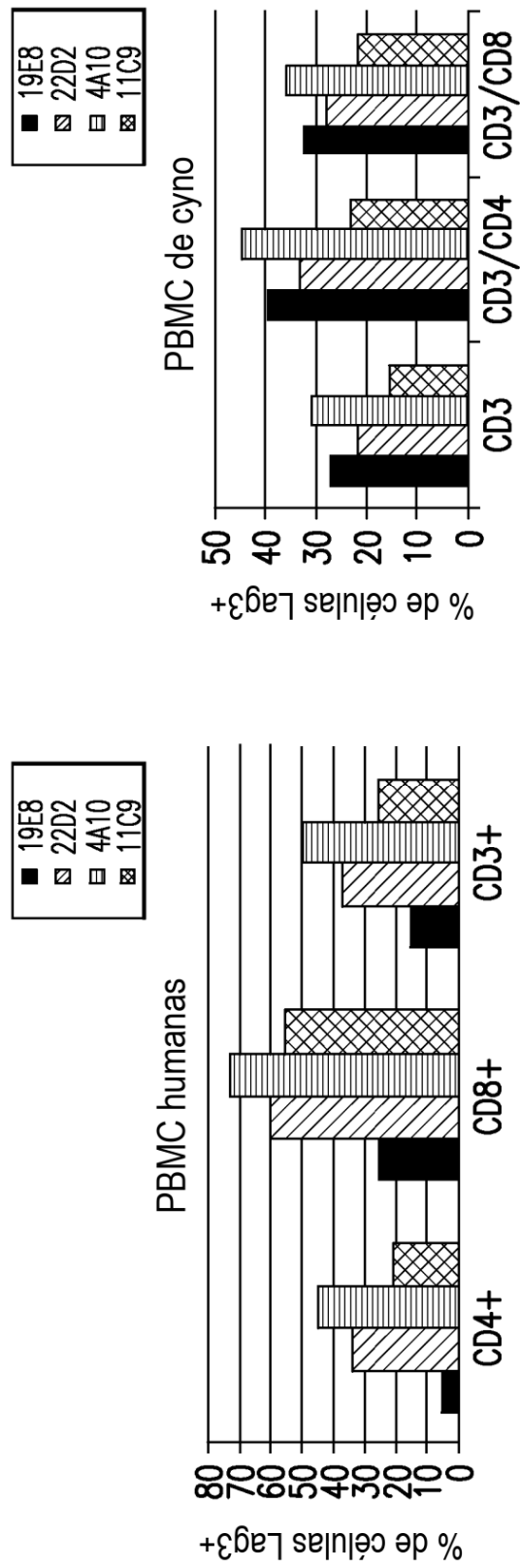


FIG.2

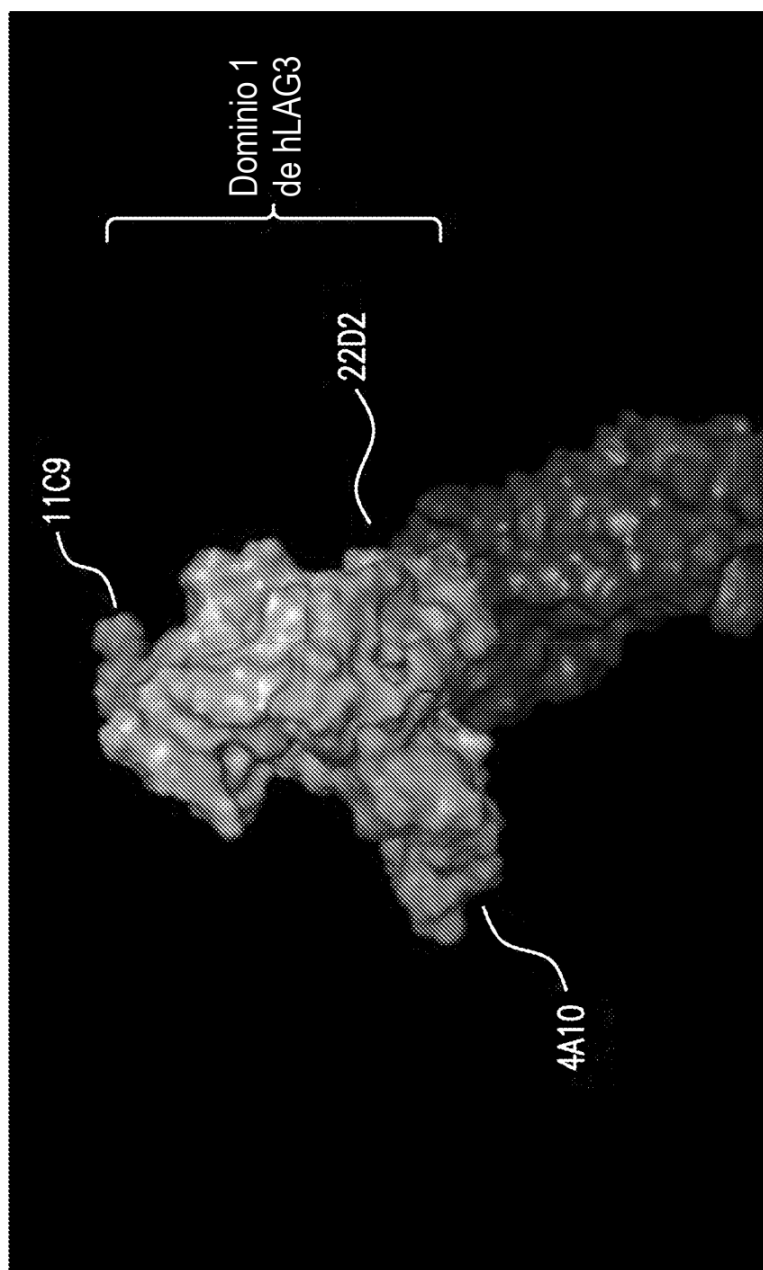
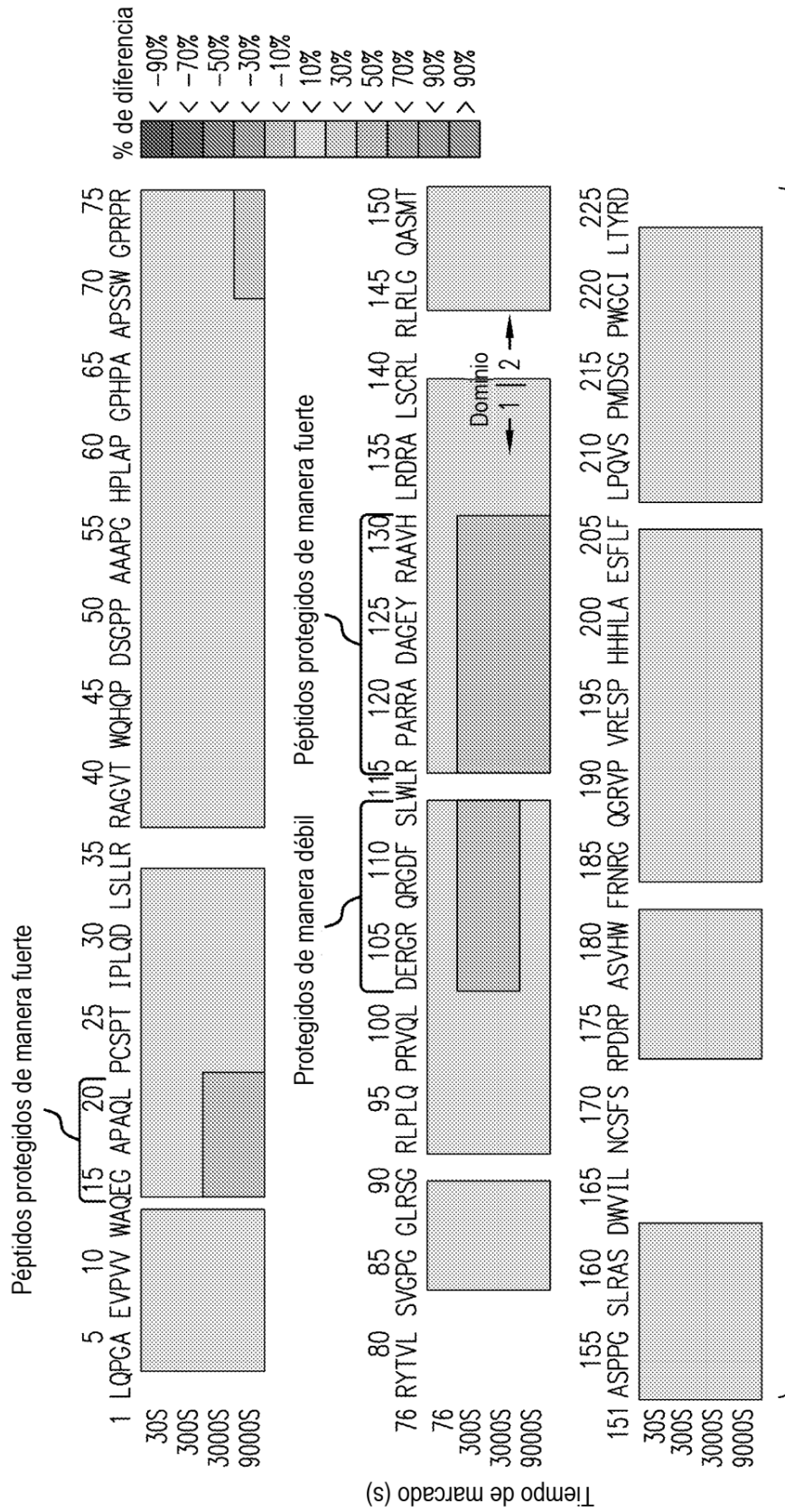


FIG.3



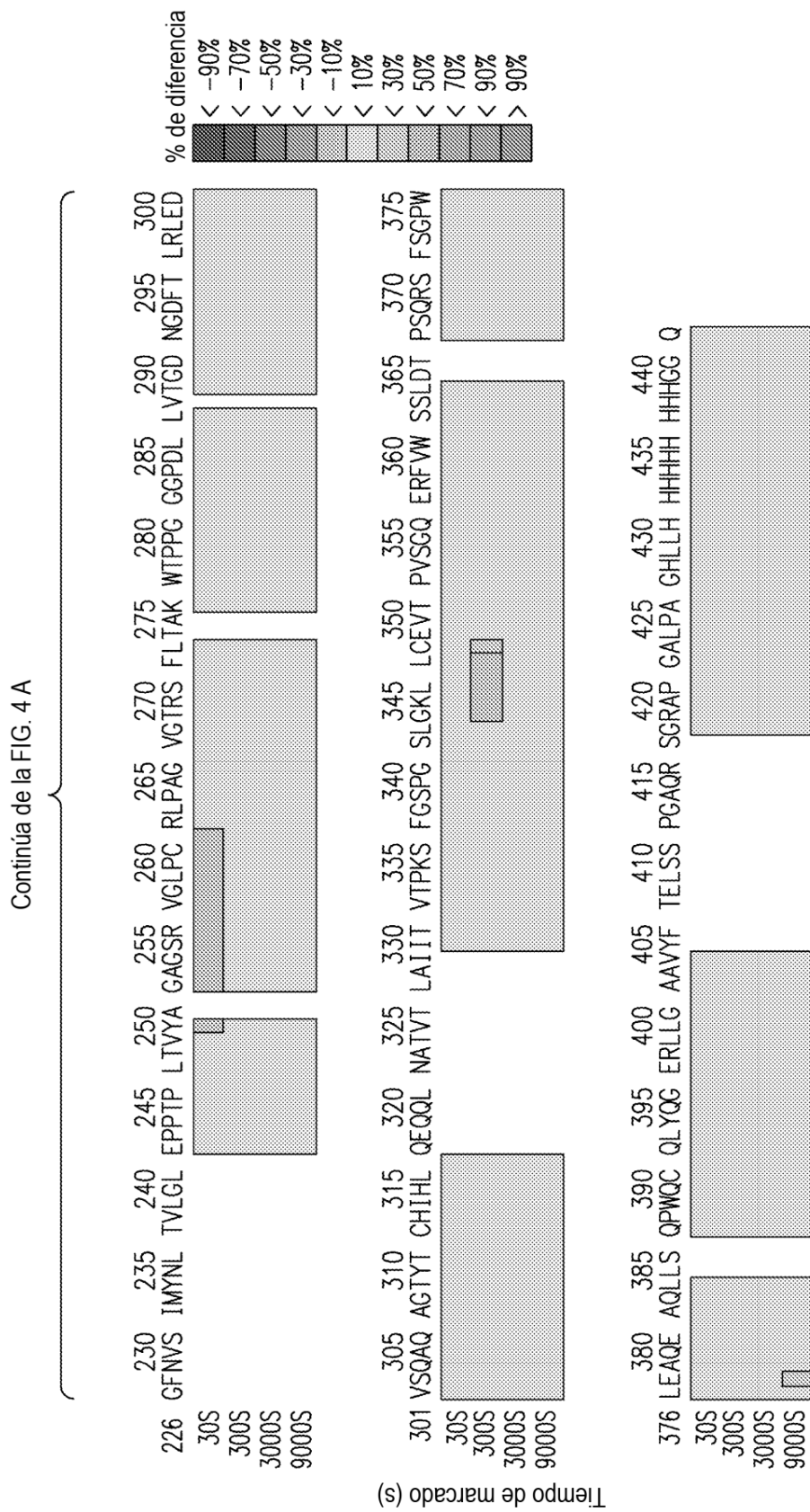
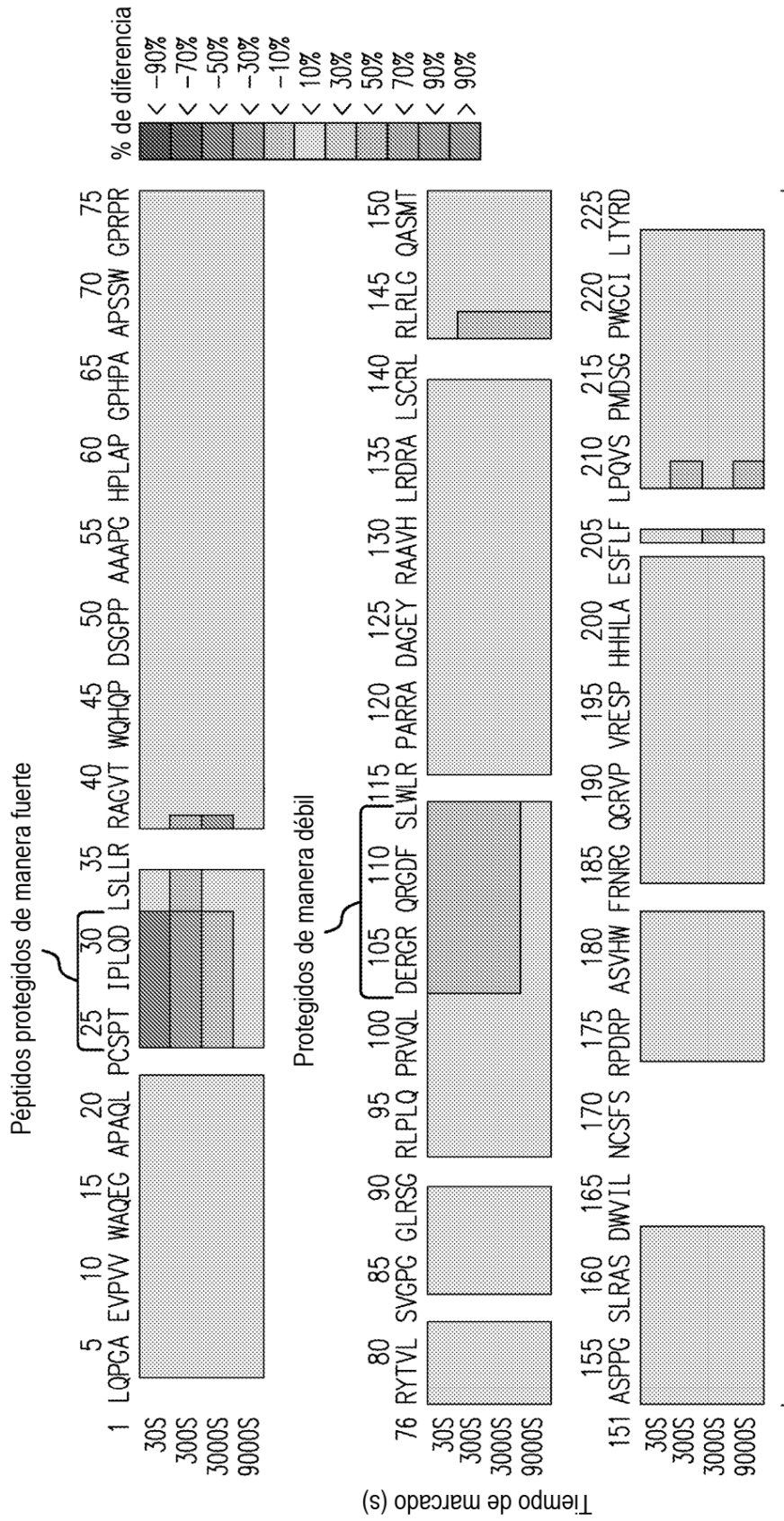


FIG.4A-1



Continúa en la FIG. 4B-1

FIG.4B

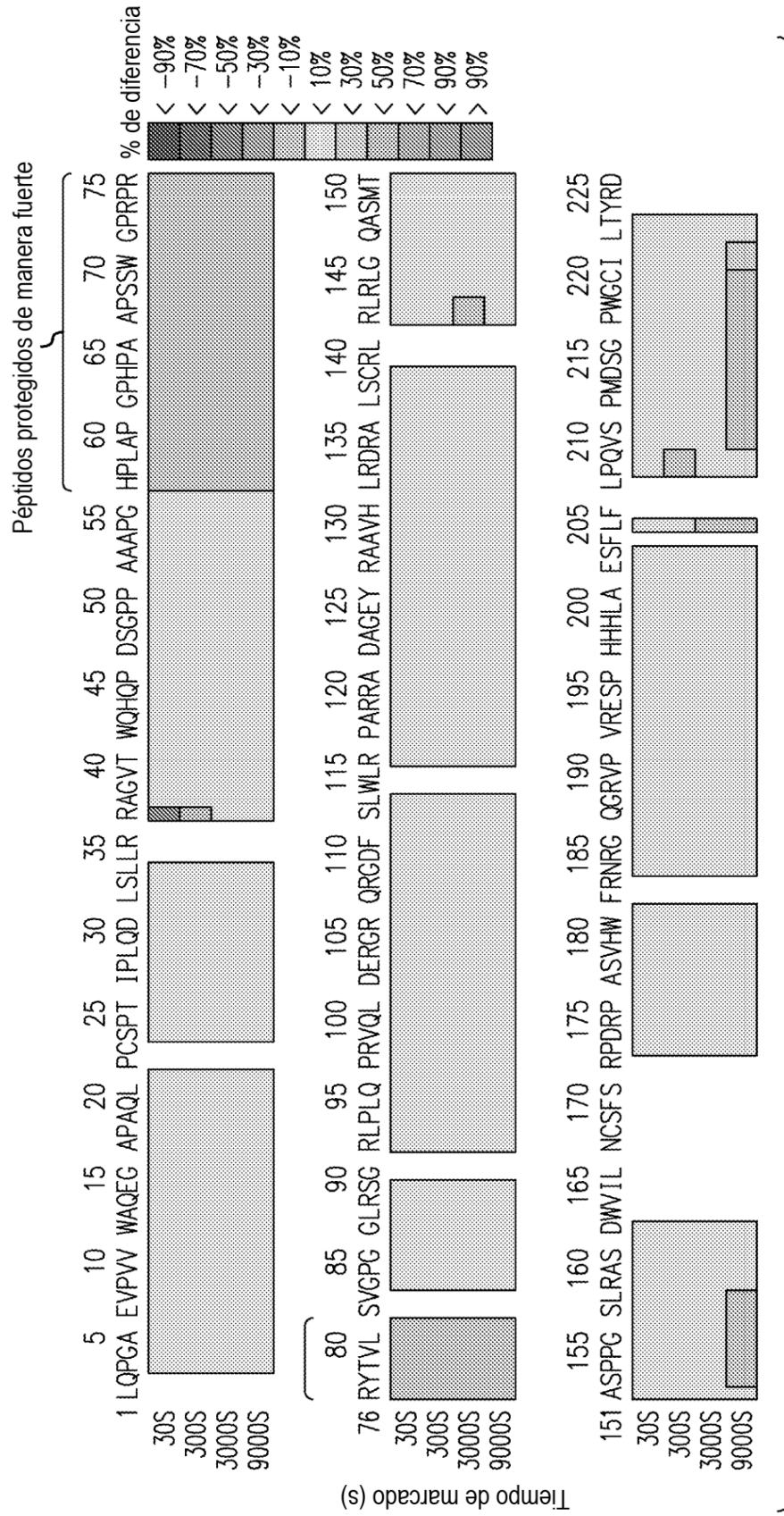


FIG.4C

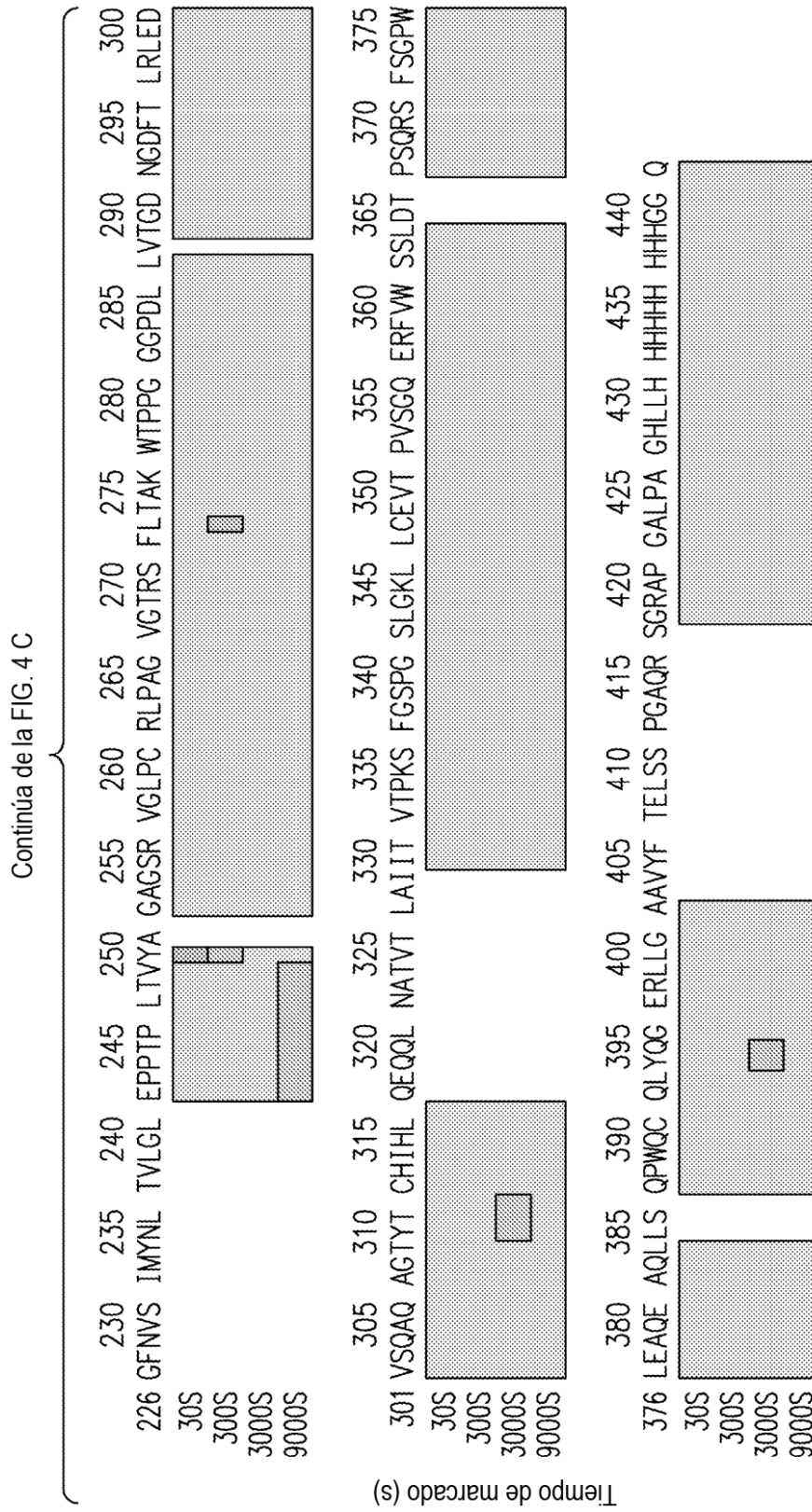
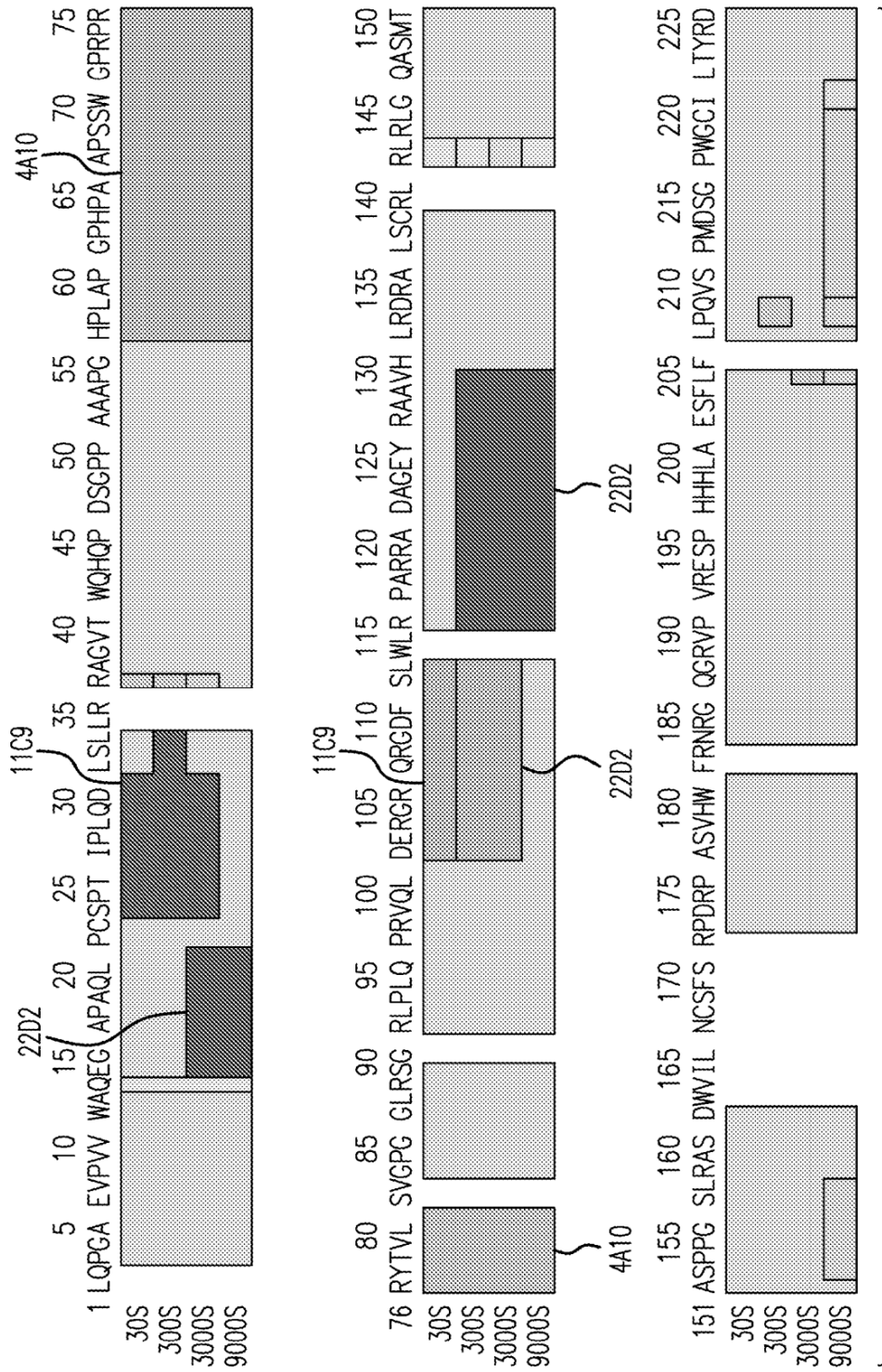


FIG.4C-1



Continúa en la FIG. 5 A-1

FIG. 5A

Continúa de la FIG. 5 A

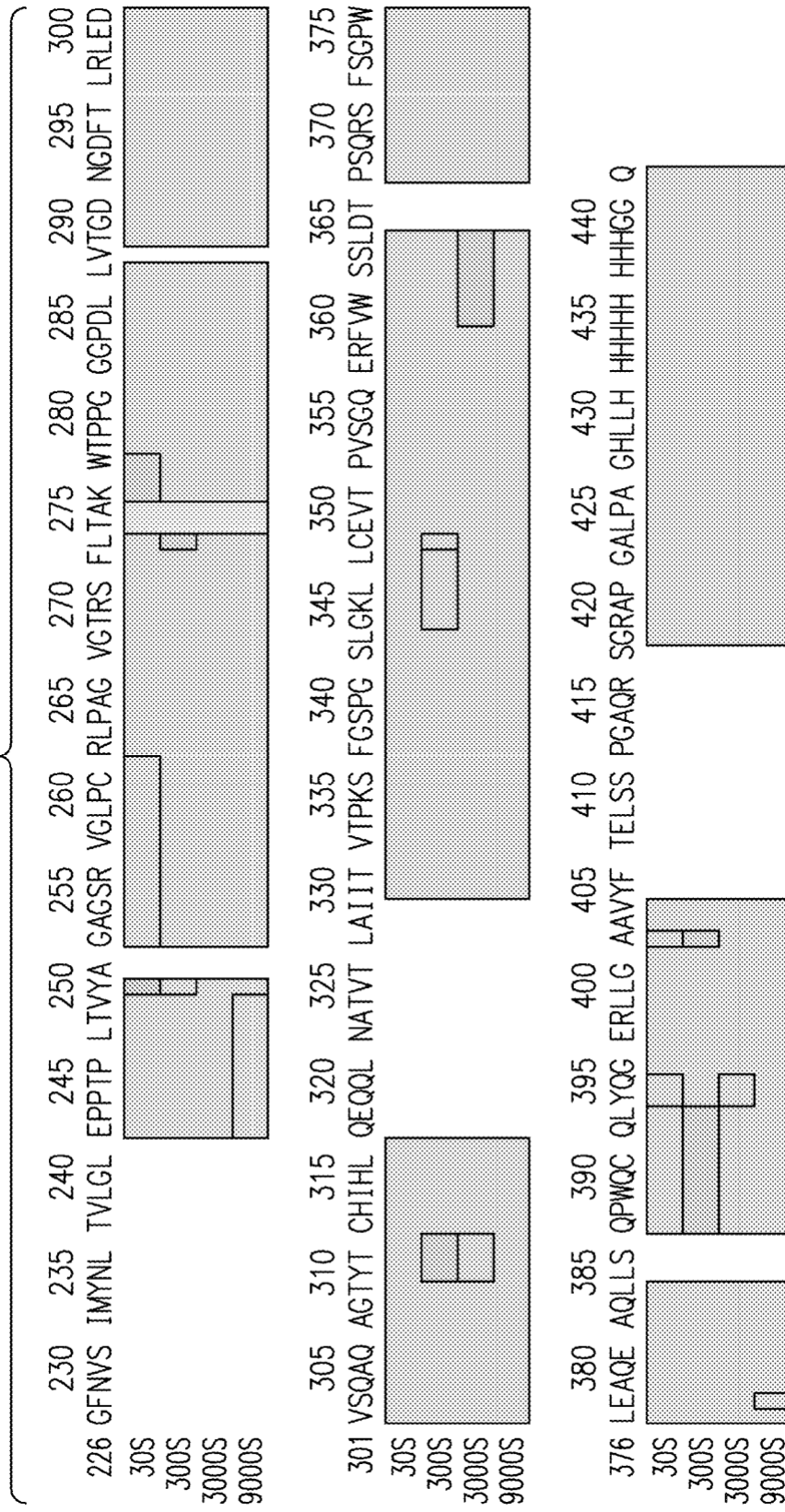


FIG.5A-1

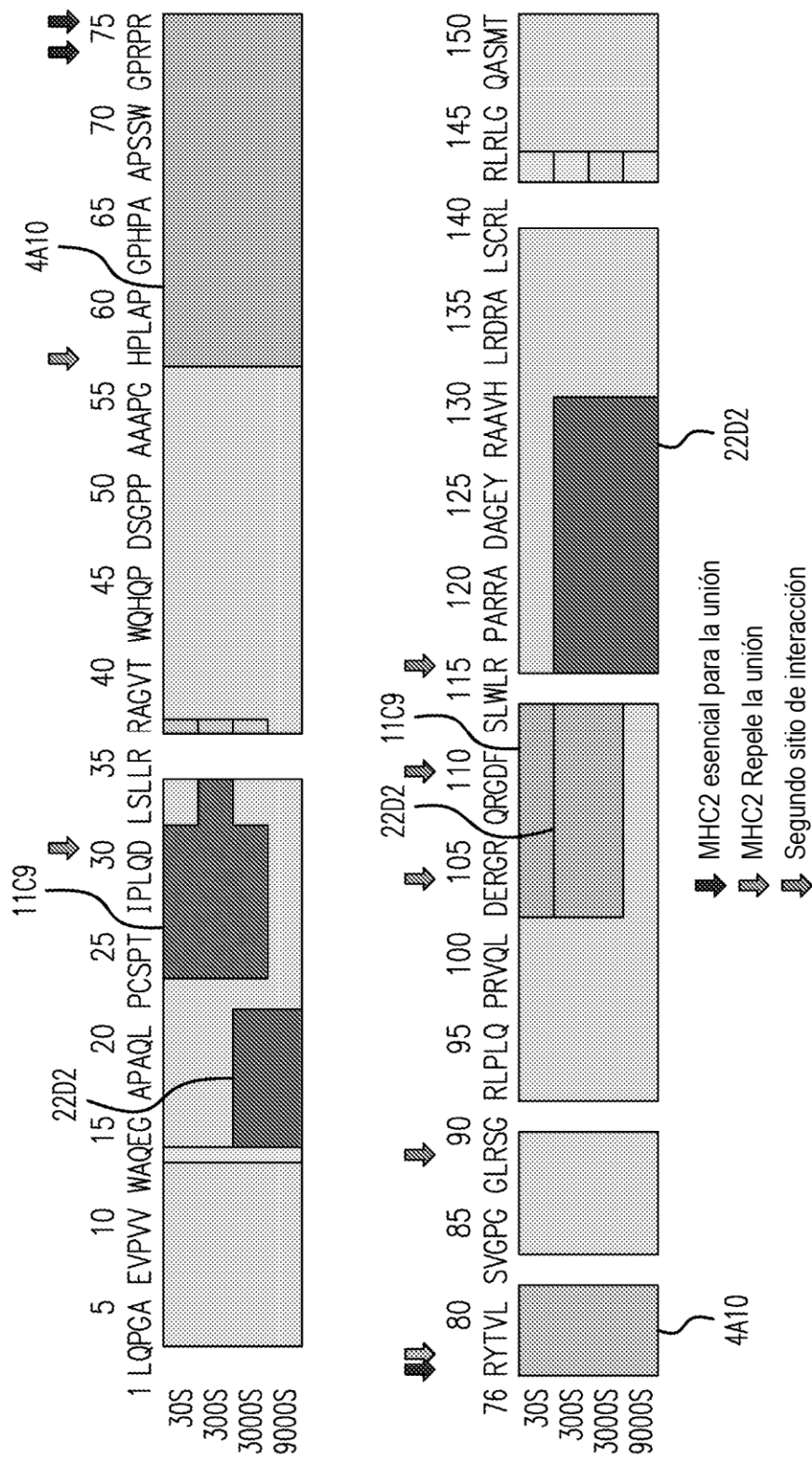
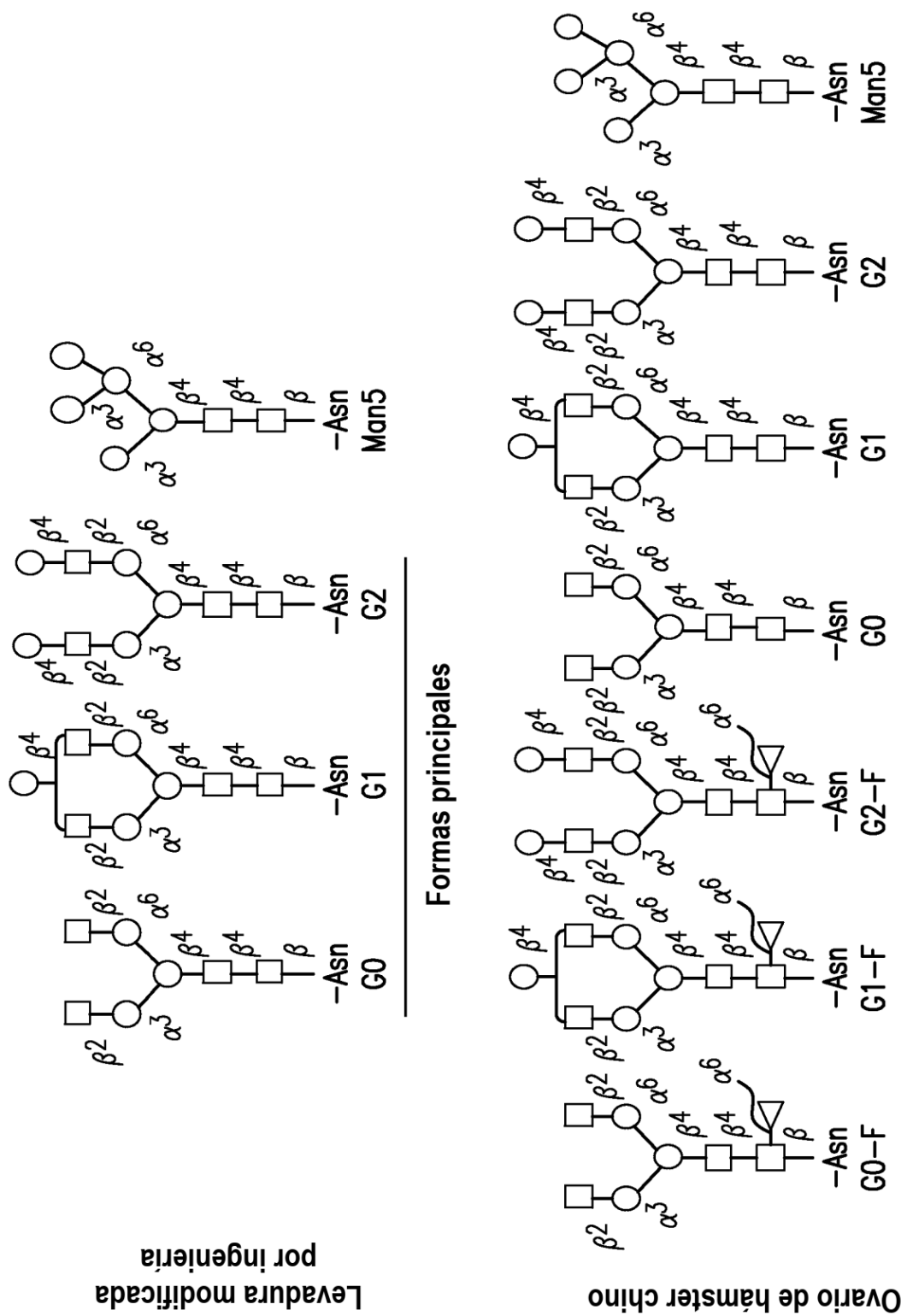


FIG.5B



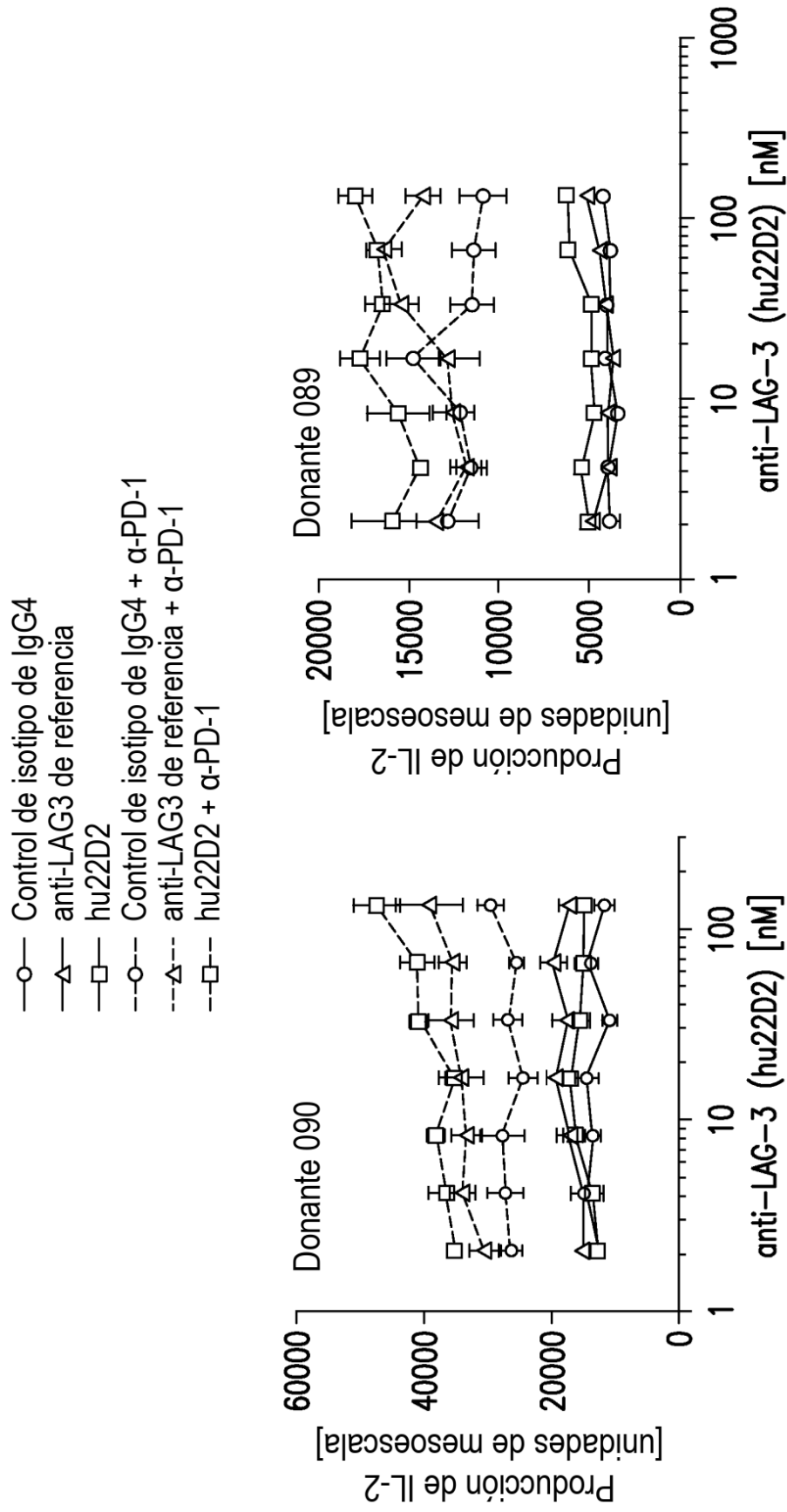


FIG.7

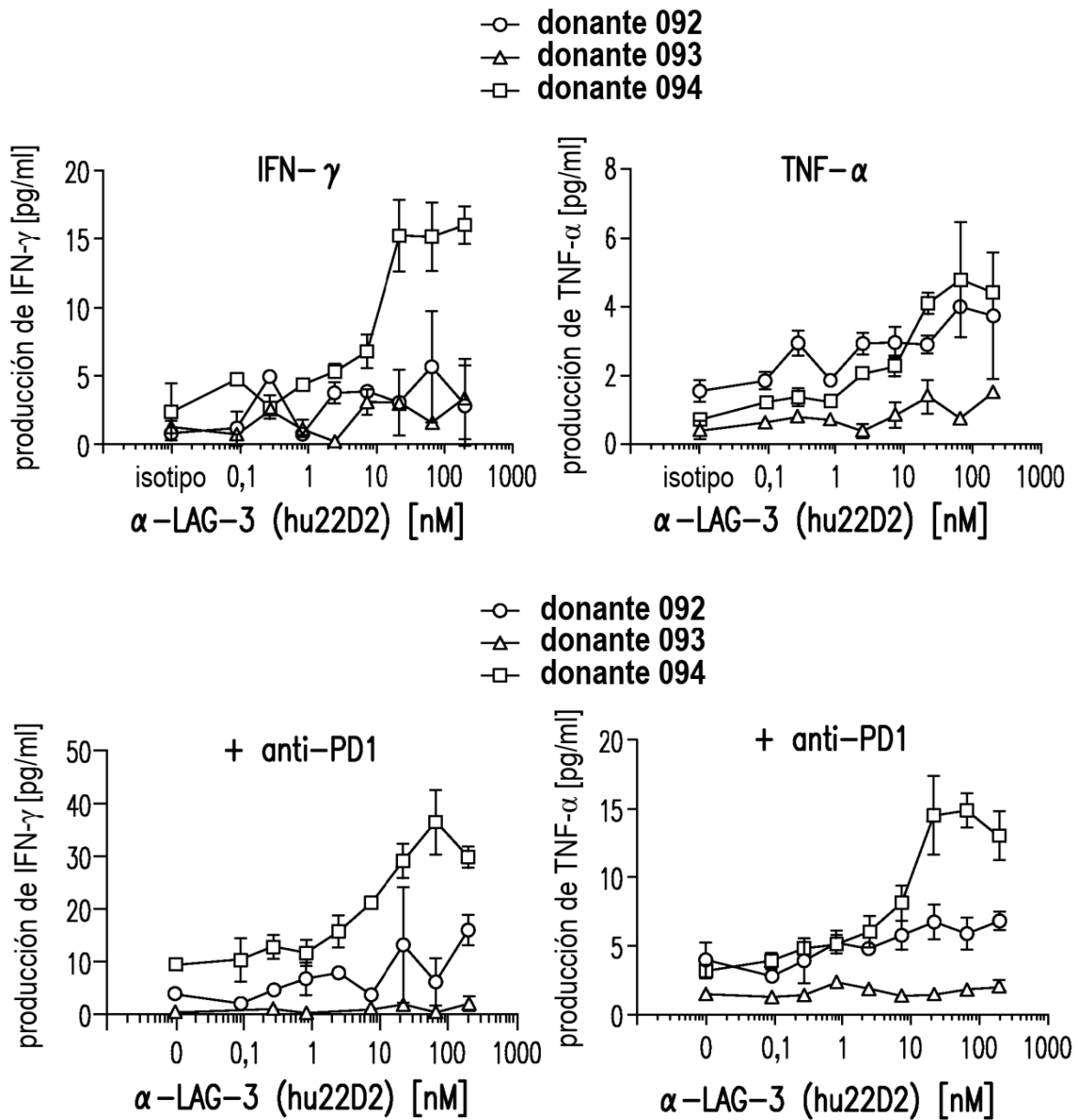


FIG.8

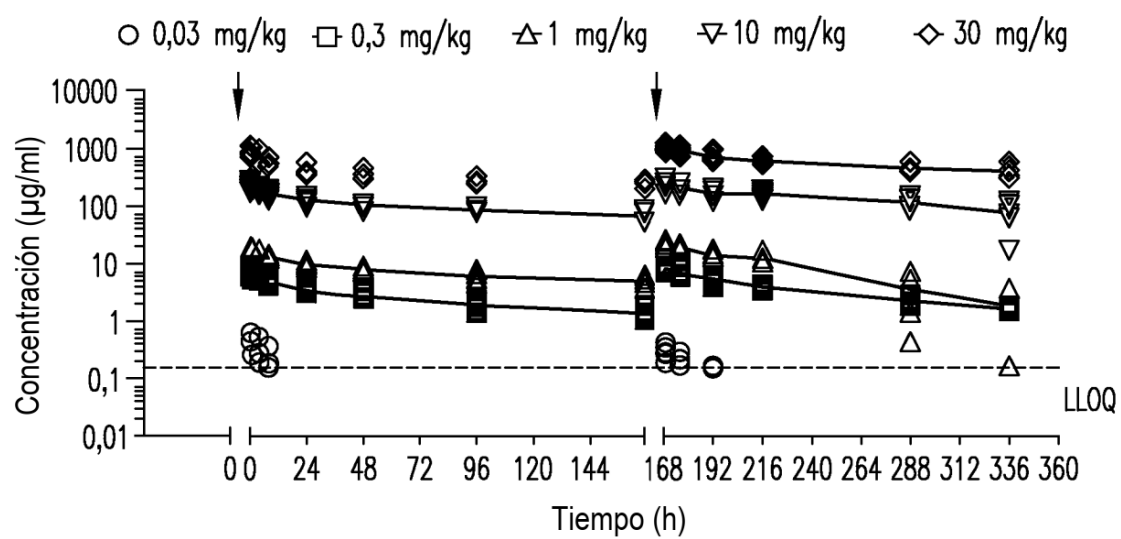


FIG.9

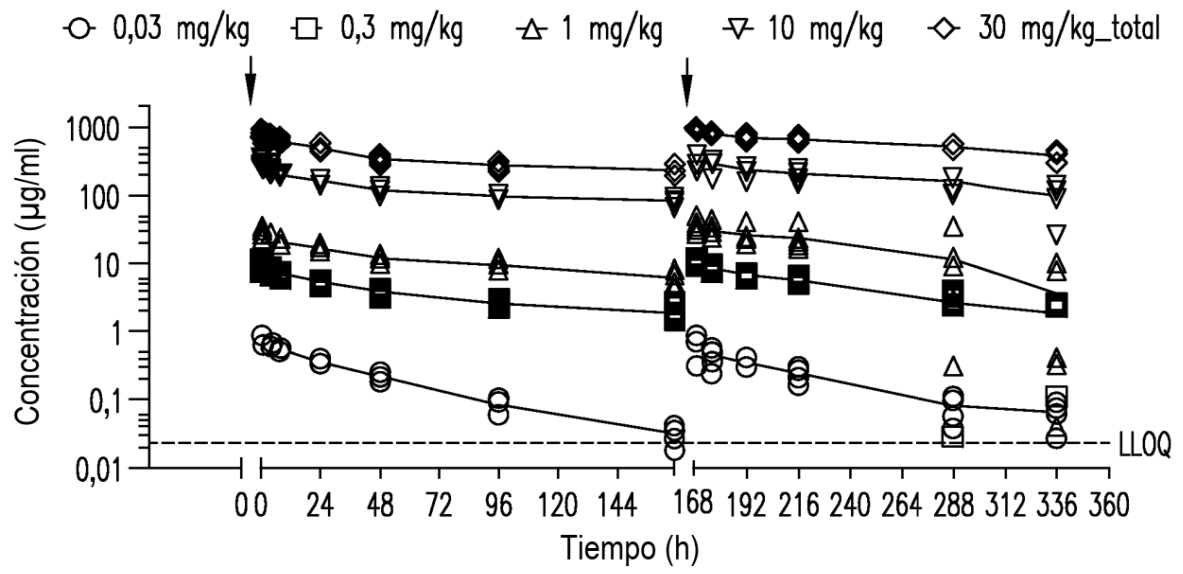
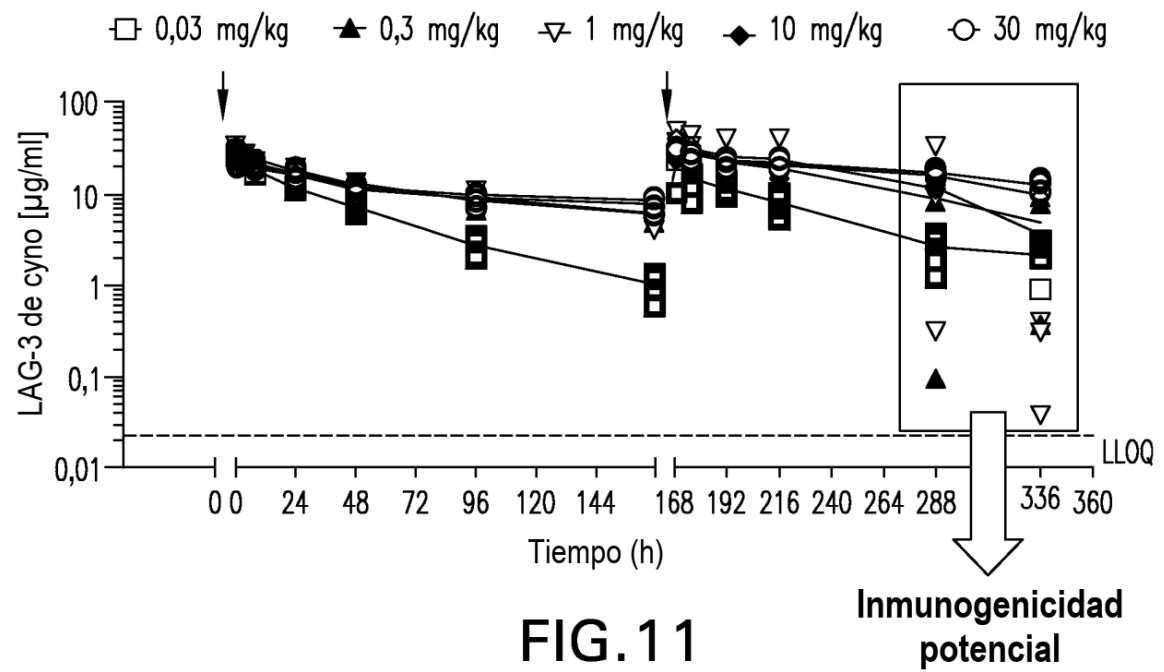


FIG.10



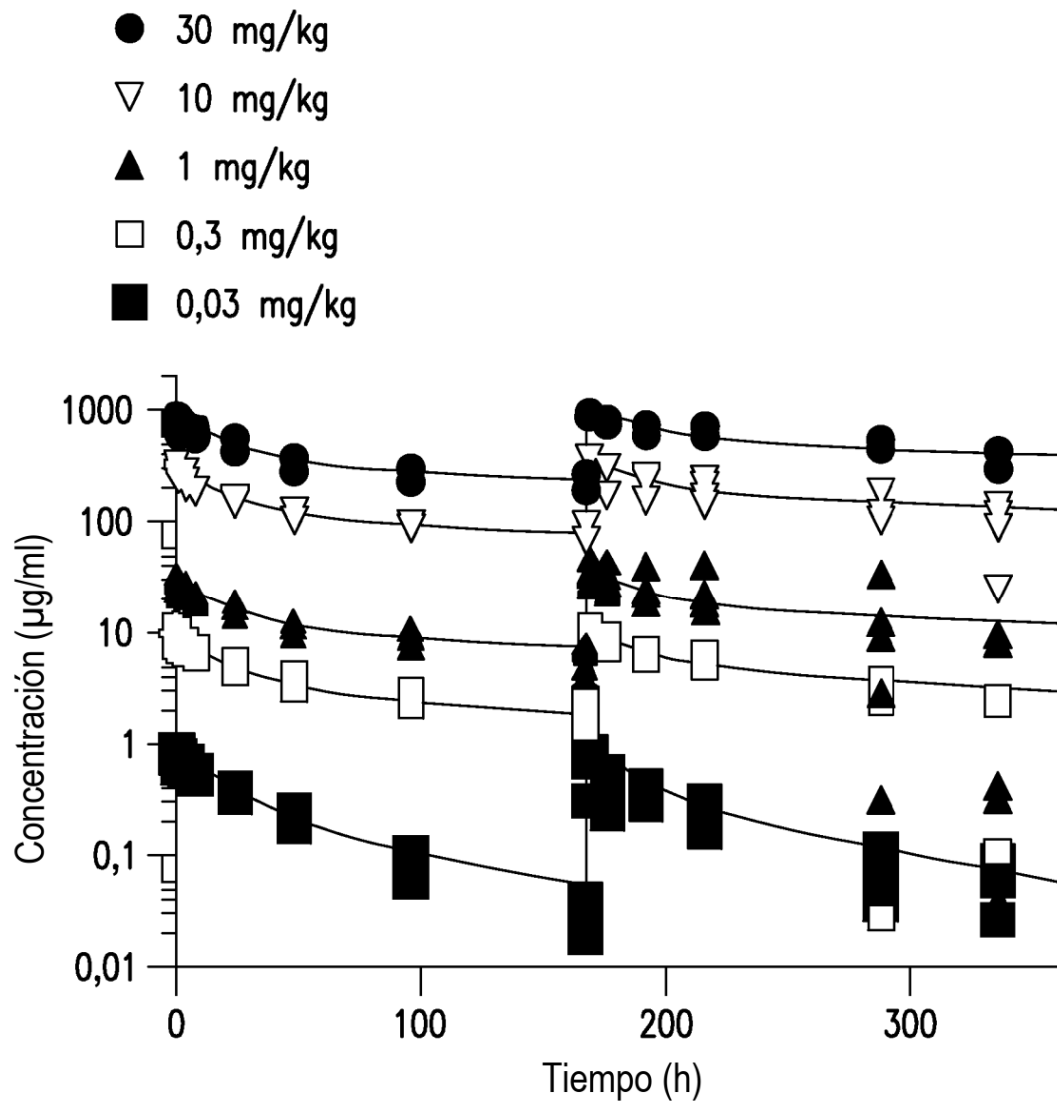


FIG.12