



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 010 640**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2017** PCT/EP2017/065052

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017** WO17220555

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2017** E 17734668 (1)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025** EP 3472206

④ Título: **Miembros de unión a LAG-3**

⑩ Prioridad:

20.06.2016 US 201662352470 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2025

⑦ Titular/es:

INVOX PHARMA LIMITED (100.00%)
Suite 2, First Floor, The Westworks, 195 Wood
Lane, White City Place
London W12 7FQ, GB

⑦ Inventor/es:

TUNA, MIHRIBAN;
WOLLERTON VAN HORCK, FRANCISCA;
EVERETT, KATY LOUISE;
GASPAR, MIGUEL;
KRAMAN, MATTHEW;
KMIECIK, KATARZYNA y
FOSH, NATALIE

⑦ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 010 640 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

Miembros de unión a LAG-3

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a miembros de unión específica que se unen al gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3). Los miembros de unión específica comprenden un sitio de unión a antígeno LAG-3 que está ubicado en dos o más bucles estructurales de un dominio CH3 del miembro de unión específica. Los miembros de unión específica de la invención encuentran aplicación, por ejemplo, en la terapia contra el cáncer. Un miembro de unión específica según la presente invención es una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo.

Antecedentes de la invención

10 El gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3; CD223) es un miembro de la superfamilia de Ig, y está genética y estructuralmente relacionado con CD4 (aunque con solo un 20 % de identidad de secuencia). Al igual que CD4, LAG-3 se une a moléculas de MHC de clase II pero con mayor afinidad que CD4 ($K_D = 60$ nM). LAG-3 se expresa en células T activadas, células NK, pDC, células B, células T y participa en la supresión inmunitaria, particularmente a través de una expresión fuerte persistente en un porcentaje de células T reguladoras (Treg) (Liang *et al.*, 2008).

15 El gen LAG-3 está ubicado en el cromosoma 12 humano, adyacente al gen CD4, y abarca 8 exones. Existen cinco transcritos alternativos, dos de los cuales generan productos proteicos: una proteína transmembrana de longitud completa y una forma monomérica soluble cortada y empalmada alternativamente. El transcripto de longitud completa codifica una proteína de 525 aminoácidos con un peso molecular de 70 kDa y tiene actividad funcional, mientras que la forma soluble parece no unirse a moléculas de MHC de clase II y su función es desconocida. La proteína LAG-3 humana de longitud completa tiene un 93 % de identidad de secuencia con LAG-3 de *Macaca fascicularis* (macaco cangrejero) y un 70 % de identidad de secuencia con LAG-3 de *Mus musculus* (ratón doméstico).

20 25 LAG-3 es una proteína transmembrana con cuatro dominios extracelulares similares a Ig (D1-D4) y una porción citoplasmática responsable de la señalización de LAG-3. El dominio citoplasmático tiene un motivo EP (ácido glutámico/prolina) que se asocia con la proteína asociada a LAG-3 (LAP) así como un motivo KIEELE que se cree que se requiere para la modulación por LAG-3 de la función de células T. Informes sobre el papel del motivo EP sugieren que puede ser responsable del tráfico de LAG-3 a la membrana de la superficie de células T (Bae *et al.*, 2014), o puede ser directamente responsable de modular la señalización aguas abajo de STAT5 durante la activación de células T (Durham *et al.*, 2014), o posiblemente ambos.

30 35 Se cree que el mecanismo inmunosupresor de LAG-3 en células T está dirigido por la reticulación de LAG-3 en células T activadas, dando como resultado una disminución del flujo de calcio y la liberación de IL-2 durante la activación de células T (Huard *et al.*, 1997). En células presentadoras de antígeno (APC), la unión a moléculas de MHC II por células T reguladoras positivas para LAG-3 provoca una disminución de la secreción de IL-12 y una regulación por disminución de CD86 (Liang *et al.*, 2008), una "señal secundaria" de activación, que da como resultado anergia de células T de activación inapropiada y/o una presentación reducida de antígeno por las APC. Los modelos de ratón con inactivación para LAG-3 son viables, con solo linfohiperproliferación leve (Workman *et al.*, 2003), lo que indica que LAG-3 actúa como un modesto "freno" inmunitario.

40 45 También se ha propuesto que esta interacción supresora entre LAG-3 y MHC de clase II se produce entre Treg y células T positivas para CD4 (Sega *et al.*, 2014). Las Treg suprimen la respuesta inmunitaria mediante la liberación de citocinas supresoras (tales como IL-10 y TGF β), la manipulación del metabolismo inflamatorio (tal como adenosina catabolizada por CD73), la regulación de la maduración de APC o la interacción directa entre células T reguladoras y células T efectoras. Existen pruebas en seres humanos de que las Treg positivas para MHC de clase II son más supresoras que las Treg negativas para MHC de clase II (Baecher-Allen *et al.*, 2006) y suprimen activamente la respuesta inmunitaria a través de la interacción directa con LAG-3 expresada en células T efectoras. Aunque las Treg negativas para LAG-3 pueden suprimir la proliferación de células T convencionales, las células T CD4 y CD8 negativas para LAG-3 son resistentes a la supresión inmunitaria de Treg. Se describió que este proceso se produce entre las células T humanas a través de un proceso conocido como trogocitosis (Sega *et al.*, 2014) por lo que las Treg no solo previenen la maduración de APC sino que también adquieren MHC de clase II para suprimir células T CD4 positivas para LAG-3 sensibilizadas.

50 55 La expresión de LAG-3 también es un marcador de estimulación antigenética repetida. En el cáncer, las células T comúnmente adoptan un fenotipo "agotado", que implica la expresión de inmunosupresores tales como PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3 (Wherry *et al.*, 2011), donde las células tienen una incapacidad general para proliferar y secretar quimiocinas adecuadamente en respuesta al antígeno. La inhibición de estos supresores inmunitarios disminuye el umbral inmunitario y (re)activa una respuesta antineoplásica apropiada por las células T. En modelos preclínicos, esto se ha corroborado usando anticuerpos antagonistas contra LAG-3, CTLA-4 y PD-1 donde se observó una disminución en la carga tumoral. Se cree que la inhibición de LAG-3 por anticuerpos antagonistas reactiva la respuesta inmunitaria en el microentorno tumoral, donde la expresión de LAG-3 en células T positivas para CD4 y células T positivas para CD8 está asociada con un fenotipo agotado, y la expresión de LAG-3 en Treg está asociada con potentes capacidades inmunosupresoras. Los anticuerpos que bloquen LAG-3 aumentan la proliferación de células T efectoras, la

producción de citocinas, la citotoxicidad y disminuyen la actividad supresora de Treg, lo que conduce a una disminución en el crecimiento tumoral.

En tumores humanos, se encontró una expresión aumentada de LAG-3 en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de carcinomas de células renales humanos y otros tumores, tales como melanomas y linfomas (Demeure *et al.*, 2001;

5 Wolchock *et al.*, 2013). De manera importante, LAG-3 también está estrechamente correlacionada con la disfunción de células T en pacientes con infección vírica crónica (Workman *et al.*, 2005) y cáncer (Workman *et al.*, 2003). LAG-3 también se ha identificado como marcador de superficie para Treg infiltrantes de tumores en una variedad de cánceres humanos (Camisachi *et al.* 2010; Gandhi *et al.*, 2006).

10 Anticuerpos monoclonales contra LAG-3 humana están en desarrollo clínico para anular la supresión inmunitaria y potenciar posiblemente la presentación de antígenos en cánceres (neoplasias malignas sólidas y hematológicas).

LAG-525 e IMP-701 (Novartis AG), son anticuerpos humanos contra LAG-3 y han avanzado a estudios clínicos de fase II y I, respectivamente, en cáncer de riñón (cáncer de células céntricas); cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC); cáncer nasofaríngeo; cáncer colorrectal; melanoma; cáncer gástrico y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.

15 El anticuerpo anti-LAG-3 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb Company), está actualmente en pruebas clínicas de fase I para cáncer de ovario; NSCLC; cáncer colorrectal; cáncer de cuello uterino; melanoma; cáncer gástrico; cáncer de vejiga; carcinoma de células escamosas de cáncer de cabeza y cuello; carcinoma de células renales y estudios de fase II en NSCLC; leucemia linfocítica crónica (CLL) con recidiva; leucemia linfocítica crónica (CLL) refractaria; melanoma; linfoma no Hodgkin; linfoma de Hodgkin; linfoma difuso de células B grandes; linfoma indolente; linfoma

20 de células del manto; mieloma múltiple refractario; y mieloma múltiple con recidiva como monoterapia o como parte de terapias de combinación.

Otros anticuerpos contra LAG-3 también están en desarrollo preclínico.

Se describe una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-L1 en el tratamiento del cáncer en Goding *et al.*, "Combination of adoptive cell transfer, anti-PD-L1 and anti-LAG-3 antibodies for the treatment of recurrent tumors", Oncoimmunology, Landes Bioscience, vol. 2, n.º 8, 2013, páginas e25050-1.

25 Sin embargo, actualmente hay pocas terapias anti-LAG-3 en pruebas clínicas y ninguna ha sido aprobada para la terapia, por lo que sigue existiendo la necesidad de desarrollar moléculas adicionales que se dirijan a LAG-3, que puedan usarse en el contexto de la terapia contra el cáncer.

Declaraciones de la invención

30 Después de un amplio programa de cribado y maduración de afinidad, los presentes inventores fueron capaces de identificar diez miembros de unión específica que comprenden un sitio de unión específica para LAG-3 en el dominio CH3 de la molécula. Se demostró que estas moléculas tenían una alta afinidad tanto por LAG-3 humana como de macaco cangrejero. Se espera que la alta afinidad por LAG-3 humana sea ventajosa en el tratamiento de, por ejemplo, cánceres que contienen linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que expresan LAG-3 en pacientes humanos, mientras que se espera que la alta afinidad por LAG-3 de macaco cangrejero, que es comparable a la afinidad por LAG-3 humana, sea útil en la evaluación de las propiedades de los miembros de unión específica en modelos de enfermedad de macaco cangrejero. El motivo de esto es que es más probable que los resultados obtenidos sean predictivos de los efectos del miembro de unión específica en pacientes humanos que cuando se somete a prueba una molécula que tiene una variabilidad más alta en su afinidad por LAG-3 humana y de macaco cangrejero en modelos de macaco cangrejero.

40 También se demostró que los miembros de unión específica tenían una alta actividad en un ensayo de activación de células T, que se espera que sea predictivo de una eficacia mejorada en pacientes humanos a través de la inhibición potenciada de LAG-3.

45 Los inventores también prepararon versiones murinas sustitutas de los miembros de unión específica que se unen a LAG-3 murina y mostraron que eran capaces de inhibir significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de ratón singénico cuando el miembro de unión específica comprendía además un sitio de unión a antígeno basado en CDR para un segundo antígeno tumoral. Basándose en el mecanismo de acción similar de LAG-3 de ratón y humana en el entorno tumoral, se espera que estudios murinos que muestran eficacia en la disminución de la carga tumoral se traduzcan en beneficios terapéuticos clínicos en pacientes humanos con cáncer. Basándose en estos datos, 50 se espera por lo tanto que los miembros de unión específica encontrarán aplicación en métodos de tratamiento de cánceres que expresan LAG-3 en pacientes humanos.

Por tanto, la presente invención proporciona un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 del miembro de unión específica, como se expone en las reivindicaciones.

55 El sitio de unión a LAG-3 comprende las secuencias de aminoácidos WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) y PYDRVWWPDE (SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos WDEPWGED está ubicada en el bucle AB del dominio CH3 del miembro de unión específica y la secuencia de aminoácidos PYDRVWWPDE está ubicada en el bucle EF del dominio CH3.

La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 está ubicada preferiblemente en los residuos 11 a 18 del dominio CH3; y/o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 está ubicada en los residuos 92 a 101 del dominio CH3; en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de ImMunoGeneTics (IMGT).

- 5 El sitio de unión a antígeno LAG-3 del miembro de unión específica puede comprender además una de las siguientes secuencias, preferiblemente en el bucle CD del dominio CH3 del miembro de unión específica:
- (i) SNGQPENNY (SEQ ID NO 2, 8 y 18);
 - (ii) SNGQPEDNY (SEQ ID NO: 13);
 - (iii) SNGYPEIEF (SEQ ID NO: 23);
 - 10 (iv) SNGIPEWNY (SEQ ID NO: 28);
 - (v) SNGYAEYNY (SEQ ID NO: 33);
 - (vi) SNGYKEENY (SEQ ID NO: 38);
 - (vii) SNGVPELNV (SEQ ID NO: 43); o
 - (viii) SNGYQEDNY (SEQ ID NO: 48).
- 15 Preferiblemente, el sitio de unión a antígeno LAG-3 del miembro de unión específica comprende además una de las siguientes secuencias, preferiblemente en el bucle CD del dominio CH3 del miembro de unión específica: la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, 28 o 38 en el bucle CD del dominio CH3. Más preferiblemente, el sitio de unión a antígeno LAG-3 del miembro de unión específica comprende además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 en el bucle CD del dominio CH3.
- 20 La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 o 48 está ubicada preferiblemente en los residuos 43 a 78 del dominio CH3 del miembro de unión específica, en donde los residuos están numerados según el esquema de numeración de IMGT.
- 25 La secuencia del dominio CH3 del miembro de unión específica, diferente de las secuencias del sitio de unión a antígeno LAG-3, no está particularmente limitada. Preferiblemente, el dominio CH3 es un dominio de inmunoglobulina G humana, tal como un dominio CH3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, lo más preferiblemente un dominio CH3 de IgG1 humana. Las secuencias de dominios CH3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana se conocen en la técnica.
- 30 En una realización preferida, el miembro de unión específica comprende el dominio CH3 expuesto en SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, más preferiblemente el dominio CH3 expuesto en SEQ ID NO: 5, 30 o 40, lo más preferiblemente el dominio CH3 expuesto en SEQ ID NO: 5. Alternativamente, el miembro de unión específica puede comprender un dominio CH3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferiblemente SEQ ID NO: 5, 30 o 40, más preferiblemente SEQ ID NO: 5.
- 35 El miembro de unión específica puede comprender además un dominio CH2. El dominio CH2 está preferiblemente ubicado en el extremo N-terminal del dominio CH3, como en el caso de una molécula de IgG humana. El dominio CH2 del miembro de unión específica es preferiblemente el dominio CH2 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, más preferiblemente el dominio CH2 de IgG1 humana. Las secuencias de dominios de IgG humana se conocen en la técnica. En una realización preferida, el miembro de unión específica comprende un dominio CH2 de IgG con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 53, o un dominio CH2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 53.
- 40 En una realización preferida, el miembro de unión específica comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 41, 42, 46, 47, 51 o 52, o una secuencia que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 41, 42, 46, 47, 51 o 52. Más preferiblemente, el miembro de unión específica comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, 7, 31, 32, 41 o 42, o una secuencia que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, 7, 31, 32, 41 o 42. Aún más preferiblemente, el miembro de unión específica comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6 o 7, o una secuencia que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6 o 7.

Preferiblemente, el miembro de unión específica comprende una región bisagra de inmunoglobulina, o parte de la misma, en el extremo N-terminal del dominio CH2. La región bisagra de inmunoglobulina permite que las dos secuencias de dominio CH2-CH3 se asocien y formen un dímero. Preferiblemente, la región bisagra, o parte de la misma, es una región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o parte de la misma. Más preferiblemente, la región bisagra, o parte de la misma, es una región bisagra de IgG1, o parte de la misma. La secuencia de la región bisagra

- 5 de IgG1 humana se muestra en SEQ ID NO: 57. Una región bisagra truncada adecuada que puede formar parte del miembro de unión específica se muestra en SEQ ID NO: 58. Esta región bisagra estaba presente en las moléculas de Fcab sometidas a prueba en los ejemplos, mientras que una región bisagra de longitud completa estaba presente en el formato de mAb² simulado. Por tanto, el miembro de unión específica comprende preferiblemente una región bisagra 10 de inmunoglobulina, o parte de la misma, en el extremo N-terminal del dominio CH2, en donde la región bisagra tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 58, o en donde la región bisagra tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al 15 menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 57 o 58. Alternativamente, el miembro de unión específica puede comprender una región bisagra de inmunoglobulina, o parte de la misma, en el extremo N-terminal del dominio CH2, en donde la región bisagra comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 57, o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento comprende al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o al menos catorce de los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

- 20 Además del sitio de unión a antígeno LAG-3 en el dominio CH3 del miembro de unión específica, el miembro de unión específica puede comprender además uno o más sitios de unión a antígeno adicionales para crear una molécula bi- o multi-específica. Preferiblemente, el miembro de unión específica comprende un sitio de unión a antígeno basado en CDR. Los sitios de unión a antígeno basados en CDR se encuentran en moléculas de inmunoglobulina de origen natural y su estructura se conoce bien en la técnica. Cuando el miembro de unión específica comprende un sitio de 25 unión a antígeno basado en CDR, el miembro de unión específica es preferiblemente una molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo no está particularmente limitada, siempre que comprenda un dominio CH3 como se define en el presente documento y un sitio de unión a antígeno basado en CDR. En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina G humana, tal como una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, más preferiblemente una molécula de IgG1 humana. Las secuencias de moléculas de inmunoglobulina G 30 humana se conocen en la técnica y la introducción de un dominio CH3 o secuencia de dominio CH3 como se divulga en el presente documento en tal molécula no presenta ninguna dificultad para el experto en la técnica.

Cuando el miembro de unión específica comprende uno o más sitios de unión a antígeno basados en CDR, el sitio de unión a antígeno basado en CDR se une preferiblemente a una molécula que es un modulador del sistema inmunitario.

- 35 Los ejemplos de moduladores del sistema inmunitario incluyen receptores inmunomoduladores y ligandos de receptores inmunomoduladores. Preferiblemente, el sitio de unión a antígeno basado en CDR se une a un inhibidor o activador del sistema inmunitario, lo más preferiblemente un inhibidor del sistema inmunitario. Ejemplos de inhibidores del sistema inmunitario preferidos son: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), inmunoglobulina de células T y proteína 3 que contiene dominio de mucina (TIM-3), CD73 y receptor del factor 1 estimulante de colonias (CSF-1R). En ciertas realizaciones, el sitio de unión a antígeno basado en CDR no es un sitio de unión para PD-L1.

- 40 El miembro de unión específica puede conjugarse además con un modulador del sistema inmunitario, molécula citotóxica, radioisótopo o marcador detectable. El modulador del sistema inmunitario puede ser una molécula citotóxica que es una citocina.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un miembro de unión específica de la invención, así como un vector que comprende tal ácido nucleico, como se expone en las reivindicaciones.

- 45 También se proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico o el vector de la invención. Tal célula hospedadora recombinante puede usarse para introducir un miembro de unión específica de la invención. Por tanto, también se proporciona un método para producir un miembro de unión específica de la invención, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora recombinante en condiciones para la producción del miembro de unión específica, como se expone en las reivindicaciones. El método puede comprender además una etapa de 50 aislamiento y/o purificación del miembro de unión específica.

Se espera que los miembros de unión específica y los anticuerpos de la presente invención encuentren aplicación en aplicaciones terapéuticas, en particular aplicaciones terapéuticas en seres humanos, tales como el tratamiento del cáncer. Por tanto, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende un miembro de unión específica según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 55 La presente invención también proporciona un miembro de unión específica de la invención, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente, como se expone en las reivindicaciones. Un paciente, como se denomina en el presente documento, es preferiblemente un paciente humano. El tratamiento puede comprender además administrar una vacuna antitumoral y/o un agente quimioterápico al paciente.

Los presentes inventores han mostrado que el tratamiento de TIL con un miembro de unión específica según la

5 presente invención que comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 del miembro de unión específica, en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1, da como resultado una expresión reducida de LAG-3 por los TIL. Se espera que la reducción en la expresión de LAG-3 reduzca el efecto inhibidor de LAG-3 y, de ese modo, permita que los TIL superen el agotamiento. Una vez que los TIL se activan, se espera que sean capaces de reconocer los neo-antígenos expresados por el tumor y de generar una respuesta contra el mismo, reduciendo de ese modo la carga tumoral.

Por lo tanto, el miembro de unión específica de la invención puede administrarse a un paciente en combinación con un segundo miembro de unión específica que se une a PD-L1, tal como una molécula de anticuerpo que se une a PD-L1.

10 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un miembro de unión específica de la invención, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el sitio de unión a antígeno basado en CDR del miembro de unión específica se une a una molécula que es un modulador del sistema inmunitario, y en donde el método comprende administrar el miembro de unión específica de la invención, y un segundo miembro de unión específica que se une a PD-L1 al paciente.

15 El miembro de unión específica de la invención y el miembro de unión específica que se une a PD-L1 pueden administrarse al paciente simultáneamente, por separado o secuencialmente.

En este contexto, el miembro de unión específica de la invención puede no comprender un sitio de unión a antígeno basado en CDR para un segundo antígeno. El miembro de unión específica de la invención, por lo tanto, solo puede unirse a LAG-3.

20 El miembro de unión específica que se une a PD-L1 puede ser una molécula de anticuerpo, o fragmento del mismo. En la técnica se conocen moléculas de anticuerpo que se unen a PD-L1. La molécula de anticuerpo puede ser humana o humanizada. La molécula de anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo monoclonal. Ejemplos de moléculas de anticuerpo son los isotipos de inmunoglobulina, tales como inmunoglobulina G, y sus subclases isotípicas, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como fragmentos de las mismas. El miembro de unión específica que se une a PD-L1 no comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3.

25 Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra una alineación de secuencia de los nueve Fcab identificados después de la segunda maduración de afinidad, FS18-7-32; FS18-7-33; FS18-7-36; FS18-7-58; FS18-7-62; FS18-7-65; FS18-7-78; FS18-7-88; y FS18-7-95, contra el Fcab parental, FS18-7-9. La identidad de secuencia de cada uno de estos Fcab con la secuencia del Fcab parental, FS18-7-9, se muestra en la Figura 1B.

30 La Figura 2 muestra que los Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos inhiben LAG-3 de ratón conduciendo a la liberación de mIL-2 en un ensayo de activación de células T DO11.10. El mAb anti-LAG-3 de ratón de referencia, C9B7W, muestra un aumento en la liberación de mIL-2, sin embargo, la liberación máxima fue significativamente menor que la de los Fcab anti-LAG-3 de ratón. El Fcab WT no mostró actividad en este ensayo.

35 La Figura 3 muestra que el Fcab anti-LAG-3, FS18-7-9, en formato de mAb² simulado, inhibe LAG-3 de macaco cangrejero conduciendo a la liberación de mIL-2 en un ensayo de activación de células T DO11.10. El mAb anti-LAG-3 de referencia, 25F7, mostró un aumento en la liberación de mIL-2, sin embargo, la liberación máxima fue aproximadamente dos tercios de la del Fcab en el formato de mAb² simulado.

40 La Figura 4 muestra que moléculas de mAb² que comprenden el Fcab anti-LAG-3 de ratón sustituto, FS18-7-108-29 y una región Fab específica para TIM-3, CD73, CSF-1R o CTLA-4 murino, son capaces de reducir significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico MC38 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

45 La Figura 5 muestra el efecto del tratamiento con anticuerpos sobre la expresión de LAG-3 de células T. Se muestra la expresión de LAG-3 en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) con CD8 (A), CD4 (B) y FoxP3 (C) tratados con FS18-29/4420, S1, FS18-29/4420 y S1, o el anticuerpo de control 4420 en los días 19 y 23 después de la inoculación del tumor, correspondientes a los días 3 y 7 después de la última dosificación de mAb²/anticuerpo, respectivamente. La expresión de LAG-3 disminuyó después del tratamiento con una combinación de FS18-29/4420 y S1 el día 23, mientras que FS18-29/4420 o S1 administrados individualmente dieron como resultado poca o ninguna disminución en la expresión de LAG-3.

Descripción detallada

50 La presente invención se refiere a miembros de unión específica que se unen a LAG-3. Específicamente, los miembros de unión específica de la presente invención comprenden un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 del miembro de unión específica, como se expone en las reivindicaciones. El término "LAG-3" puede referirse a LAG-3 humana, LAG-3 murina y/o LAG-3 de macaco cangrejero, a menos que el contexto requiera lo contrario. Preferiblemente, el término "LAG-3" se refiere a LAG-3 humana.

La expresión "miembro de unión específica" describe una inmunoglobulina, o fragmento de la misma, que comprende

un dominio constante, preferiblemente un dominio CH3, que comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3. Preferiblemente, el miembro de unión específica comprende un dominio CH2 y CH3, en donde el dominio CH2 o CH3, preferiblemente el dominio CH3, comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3. En una realización preferida, el miembro de unión específica comprende además una región bisagra de inmunoglobulina, o parte de la misma, en el extremo N-terminal del dominio CH2. Tal molécula también se denomina fragmento Fc de unión a antígeno, o FcabTM, en el presente documento. El miembro de unión específica puede producirse parcial o totalmente de manera sintética.

La expresión "miembro de unión específica", como se usa en el presente documento, incluye por tanto fragmentos, siempre que dichos fragmentos comprendan un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 del miembro de unión específica. A menos que el contexto requiera lo contrario, el término "miembro de unión específica", como se usa en el presente documento, es por tanto equivalente a "miembro de unión específica o fragmento del mismo".

El miembro de unión específica es una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo. La molécula de anticuerpo puede ser humana o humanizada. La molécula de anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo monoclonal. Ejemplos de moléculas de anticuerpo son los isotipos de inmunoglobulina, tales como inmunoglobulina G, y sus subclases isotípicas, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como fragmentos de las mismas.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químéricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir las CDR, o regiones variables, en una inmunoglobulina diferente. La introducción de las CDR de una inmunoglobulina en otra inmunoglobulina se describe, por ejemplo, en los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Podrían emplearse técnicas similares para las secuencias relevantes de dominios constantes que proporcionan el sitio de unión a antígeno LAG-3. Alternativamente, un hibridoma u otra célula que produzca un miembro de unión específica puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Un ejemplo de un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio CH3 es un dominio Fc de un anticuerpo. Un ejemplo de un fragmento de anticuerpo que comprende tanto secuencias de CDR como dominio CH3 es un minicuerpo, que comprende un scFv unido a un dominio CH3 (Hu *et al.* (1996), *Cancer Res.*, 56(13):3055-61).

El miembro de unión específica de la presente invención se une a LAG-3. La unión en este contexto puede referirse a una unión específica. El término "específico" puede referirse a la situación en la que el miembro de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica, en este caso LAG-3. El término "específica" también es aplicable cuando el miembro de unión específica es específico para epítopos particulares, tales como epítopos en LAG-3, que portan varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica será capaz de unirse a los diversos antígenos que portan el epítopo.

LAG-3 comparte un 40 % de identidad de secuencia con CD4, su proteína más estrechamente relacionada. Los presentes inventores sometieron a prueba el Fcab FS18-7-9, que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO 1 a 3, para la unión a CD4. El Fcab FS18-7-9 no mostró unión a CD4, demostrando que el miembro de unión específica se une específicamente a LAG-3. Por tanto, en una realización preferida, el sitio de unión a LAG-3 de un miembro de unión específica de la presente invención no se une, o no muestra ninguna unión significativa, a CD4.

Un miembro de unión específica de la invención comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3, como se expone en las reivindicaciones. El sitio de unión a antígeno LAG-3 está ubicado en un dominio CH3. El sitio de unión a LAG-3 comprende las secuencias de aminoácidos WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) y PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3). Estas secuencias estaban presentes en todos los clones de Fcab anti-LAG-3 líderes identificados por los presentes inventores siguiendo un programa de cribado y caracterización extenso como se describe en los ejemplos.

Las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO 1 y 2 están ubicadas en bucles estructurales del dominio constante del miembro de unión específica, como se expone en las reivindicaciones. La introducción de secuencias en las regiones de bucle estructurales de dominios constantes de anticuerpos para crear nuevos sitios de unión a antígeno se describe, por ejemplo, en los documentos WO2006/072620 y WO2009/132876.

Los bucles estructurales de dominios constantes de anticuerpos incluyen los bucles AB, CD y EF. En el dominio CH3, los bucles AB, CD y EF están ubicados en los residuos 11-18, 43-78 y 92-101 del dominio CH3, donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de ImMunoGeneTics (IMGT). La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 está ubicada preferiblemente en el bucle AB del dominio constante. La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 está ubicada preferiblemente en el bucle EF del dominio constante. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 está ubicada en los residuos 11 a 18 del dominio CH3; y/o la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 está ubicada en los residuos 92 a 101 del dominio CH3, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

Además, el miembro de unión específica comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 o 48, más preferiblemente SEQ ID NO: 2, 28 o 38, aún más preferiblemente SEQ ID NO: 2, en un bucle estructural de un dominio constante del miembro de unión específica. El bucle estructural

es preferiblemente el bucle CD y el dominio constante es preferiblemente el dominio CH3. La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 o 48 está ubicada preferiblemente en los residuos 43 a 78 del dominio CH3, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

- 5 Un miembro de unión específica de la invención puede comprender además un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 36 y/o un residuo de tirosina (Y) en la posición 85.2 del dominio CH3 (como se muestra en la Figura 1A), en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT. En particular, un miembro de unión específica que comprende la región de bucle estructural CD expuesta en SEQ ID NO: 8 comprende además preferiblemente un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 36 del dominio CH3. De manera similar, un miembro de unión específica que comprende la región de bucle estructural CD expuesta en SEQ ID NO: 18 comprende preferiblemente además un residuo de tirosina (Y) en la posición 85.2 del dominio CH3.
- 10

En una realización preferida, el miembro de unión específica de la invención comprende un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferiblemente un dominio CH3 con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, 30 o 40, más preferiblemente, un dominio CH3 con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5.

15

El miembro de unión específica de la invención puede comprender un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, en donde la secuencia del dominio CH3 comprende además un residuo de lisina (K) en el extremo C-terminal inmediato de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50. Así, por ejemplo, el miembro de unión específica de la invención 20 puede comprender un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 con un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5. La secuencia de tal dominio CH3 sería entonces la siguiente:

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 98)

Además, el miembro de unión específica de la invención puede comprender un dominio CH2 de una molécula de 25 inmunoglobulina G, tal como un dominio CH2 de una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferiblemente, el miembro de unión específica de la invención comprende un dominio CH2 de una molécula de IgG1. El dominio CH2 puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 53.

El dominio CH2 del miembro de unión específica puede comprender una mutación para reducir o anular la unión del dominio CH2 a uno o más receptores de Fc y, tales como FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII y/o complemento. Los dominios CH2 de dominios de IgG humana normalmente se unen a receptores de Fc y complemento y los inventores postulan que la unión reducida a receptores de Fc y reducirá la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la unión reducida al complemento reducirá la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del miembro de unión específica. Las mutaciones para reducir o anular la unión del dominio CH2 a uno o más receptores de Fc y el complemento se conocen e incluyen la "mutación LALA" descrita en Bruhns, et al. (2009) y Xu et al. (2000). Por tanto, el miembro de unión específica puede comprender un dominio CH2, en donde el dominio CH2 comprende residuos de alanina en las posiciones 4 y 5 del dominio CH2, en donde la numeración es según el esquema de numeración de IMGT. Por ejemplo, el miembro de unión específica comprende un dominio CH2 de IgG1 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 54.

40 Un miembro de unión específica según la presente invención puede comprender un segundo sitio de unión a antígeno, preferiblemente un sitio de unión a antígeno basado en CDR. La expresión "sitio de unión a antígeno basado en CDR" se refiere al sitio de unión a antígeno de una región variable de miembro de unión específica que se compone de seis residuos de CDR.

45 El segundo sitio de unión a antígeno es preferiblemente específico para un antígeno tumoral. Más preferiblemente, el segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a una molécula que es un modulador del sistema inmunitario, tal como un receptor inmunomodulador o un ligando para un receptor inmunomodulador. Por ejemplo, el segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a una molécula que es un inhibidor o activador del sistema inmunitario, preferiblemente un inhibidor del sistema inmunitario. Los ejemplos de inhibidores del sistema inmunitario incluyen proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), inmunoglobulina de células T y proteína 3 que contiene dominio de mucina (TIM-3) y receptor del factor 1 estimulante de colonias (CSF1R).

50 Las moléculas de anticuerpo contra un antígeno dado, tal como un antígeno tumoral, y la determinación de las secuencias de CDR de tal molécula de anticuerpo, están dentro de las capacidades del experto en la técnica y se conocen muchas técnicas adecuadas en la técnica. Además, en la técnica se conocen anticuerpos, incluyendo las secuencias de CDR, contra diversos moduladores del sistema inmunitario. Por lo tanto, el experto en la técnica no tendría dificultad para preparar un miembro de unión específica que comprenda, además de un sitio de unión a LAG-3 como se describe en el presente documento, un sitio de unión a antígeno basado en CDR para un segundo antígeno.

55

Los miembros de unión específica de la presente invención también pueden comprender variantes del bucle

estructural, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, CDR, dominio VH, dominio VL, secuencias de cadena ligera o cadena pesada divulgadas en el presente documento, siempre que estén dentro del alcance de las reivindicaciones. Pueden obtenerse variantes adecuadas por medio de métodos de alteración de secuencias, o mutación, y cribado. En una realización preferida, un miembro de unión específica que comprende una o más secuencias variantes retiene una o más de las características funcionales del miembro de unión específica parental, tal como especificidad de unión y/o afinidad de unión por LAG-3. Por ejemplo, un miembro de unión específica que comprende una o más secuencias variantes se une preferiblemente a LAG-3 con la misma afinidad, o una afinidad mayor, que el miembro de unión específica (parental). El miembro de unión específica parental es un miembro de unión específica que no comprende la(s) sustitución/sustituciones, delección/delecciones y/o inserción/inserciones de aminoácidos que se han incorporado en el miembro de unión específica variante.

Por ejemplo, un miembro de unión específica de la invención puede comprender un bucle estructural, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, CDR, dominio VH, dominio VL, secuencia de cadena ligera o cadena pesada que tiene al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,1 %, al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 %, al menos el 99,7 %, al menos el 99,8 % o al menos el 99,9 % de identidad de secuencia con un bucle estructural, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, CDR, dominio VH, dominio VL, secuencia de cadena ligera o cadena pesada divulgado en el presente documento, siempre que esté dentro del alcance de las reivindicaciones.

En una realización preferida, el miembro de unión específica de la invención comprende una secuencia de dominio CH3 que tiene al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,1 %, al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 %, al menos el 99,7 %, al menos el 99,8 % o al menos el 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de dominio CH3 expuesta en SEQ ID NO: 4, 5 o 98.

En una realización preferida adicional, el miembro de unión específica de la invención comprende una secuencia de dominio CH3 y CH2, que tiene al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,1 %, al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 %, al menos el 99,7 %, al menos el 99,8 % o al menos el 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de dominio CH2 y CH3 expuesta en SEQ ID NO: 6 o 7.

La identidad de secuencia se define comúnmente con referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelrys Inc., San Diego, EE. UU.). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Generalmente, se usan parámetros por defecto, con una penalización de creación de hueco = 12 y una penalización de extensión de hueco = 4. Puede preferirse el uso de GAP pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo BLAST (que usa el método de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410), FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197), o el programa TBLASTN, de Altschul *et al.* (1990) citado anteriormente, empleando generalmente parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (*Nucl. Acids Res.* (1997) 25: 3389-3402).

Un miembro de unión específica de la invención también puede comprender un bucle estructural, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, CDR, dominio VH, dominio VL, secuencia de cadena ligera o cadena pesada que tiene una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), preferiblemente 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración en comparación con un bucle estructural, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, CDR, dominio VH, dominio VL, secuencia de cadena ligera o cadena pesada divulgado en el presente documento, siempre que esté dentro del alcance de las reivindicaciones. En particular, pueden hacerse alteraciones en una o más regiones marco del miembro de unión específica.

En una realización preferida, el miembro de unión específica de la invención puede comprender una secuencia de dominio CH3 con una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), preferiblemente 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración en comparación con la secuencia de dominio CH3 expuesta en SEQ ID NO: 4, 5 o 98.

En una realización preferida adicional, el miembro de unión específica de la invención comprende una secuencia de dominio CH3 y CH2, con una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), preferiblemente 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración o menos, o 1 alteración en comparación con la secuencia de dominio CH2 y CH3 expuesta en SEQ ID NO: 6 o 7.

El miembro de unión específica de la invención se une preferiblemente a LAG-3 con una afinidad (K_D) de 1×10^{-9} M o una afinidad mayor. Por ejemplo, el miembro de unión específica de la invención puede unirse a LAG-3 con una afinidad (K_D) de 8×10^{-10} M, o una afinidad mayor.

La afinidad de unión de un miembro de unión específica a un antígeno afín, tal como LAG-3, puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo. La afinidad de unión de un miembro de unión específica a un antígeno afín, tal como LAG-3, expresado en una superficie celular, puede determinarse por citometría de flujo.

5 Los Fcab tienen una interfaz de unión más pequeña que los anticuerpos monoclonales ya que los sitios de unión de los Fcab forman un fragmento de anticuerpo relativamente compacto con dos sitios de unión situados en estrecha proximidad. En contraste, los brazos Fab de un mAb típico están separados por una región bisagra flexible. Los dos sitios de unión a antígeno de un Fcab también están espacialmente cerca uno del otro, en comparación con aquellos de un mAb típico. Basándose en esta interfaz de unión más pequeña y la flexibilidad reducida de los dos sitios de unión, fue sorprendente que los Fcab anti-LAG-3 pudieran unirse a e inhibir LAG-3 con afinidad y potencia similares a las de un producto de referencia de anticuerpo monoclonal.

10 El miembro de unión específica de la presente invención es preferiblemente capaz de unirse a LAG-3 expresada en la superficie de una célula. La célula es preferiblemente una célula cancerosa.

15 Cuando el miembro de unión específica comprende un segundo sitio de unión a antígeno, tal como un sitio de unión a antígeno basado en CDR, específico para un segundo antígeno, el miembro de unión específica es preferiblemente capaz de unirse simultáneamente a LAG-3 y al segundo antígeno. Preferiblemente, el miembro de unión específica es capaz de unirse simultáneamente a LAG-3 y al segundo antígeno, en donde la LAG-3 y el segundo antígeno se expresan en la superficie de una sola célula, o en la superficie de dos células separadas.

20 El miembro de unión específica de la invención puede unirse a LAG-3 humana, LAG-3 murina y/o LAG-3 de macaco cangrejero. Preferiblemente, el miembro de unión específica de la invención se une a LAG-3 humana.

25 20 En una realización, el miembro de unión específica de la invención no es un miembro de unión específica, tal como una molécula de anticuerpo, que comprende un sitio de unión a antígeno, tal como un sitio de unión a antígeno basado en CDR, para PD-L1.

25 En ciertos ejemplos, el miembro de unión específica de la invención no es un miembro de unión específica, tal como una molécula de anticuerpo, que comprende (i) un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1; y (ii) un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 del miembro de unión específica.

30 En un ejemplo adicional, el miembro de unión específica de la invención no es un miembro de unión específica, tal como una molécula de anticuerpo, que se une a PD-L1 y LAG-3, en donde la molécula de anticuerpo comprende:

(i) un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1; y

(ii) un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo,

35 30 en donde el sitio de unión a LAG-3 comprende las secuencias de aminoácidos WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) y PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3), y en donde la secuencia de aminoácidos WDEPWGED está ubicada en un primer bucle estructural del dominio CH3 y la secuencia de aminoácidos PYDRWVWPDE está ubicada en un segundo bucle estructural del dominio CH3. El miembro de unión específica de la presente invención puede conjugarse con un agente terapéutico o marcador detectable. En este caso, el miembro de unión específica puede denominarse conjugado. Por 40 35 ejemplo, el miembro de unión específica puede conjugarse con un modulador del sistema inmunitario, molécula citotóxica, radioisótopo o marcador detectable. El modulador del sistema inmunitario o la molécula citotóxica puede ser una citocina. El marcador detectable puede ser un radioisótopo, por ejemplo, un radioisótopo no terapéutico.

45 40 El miembro de unión específica puede conjugarse con el agente terapéutico o marcador detectable, por medio de un enlazador o enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicho agente terapéutico o marcador detectable y el miembro de unión específica o un componente de cadena polipeptídica del mismo. Otros medios para la conjugación incluyen conjugación química, especialmente reticulación usando un reactivo bifuncional (por ejemplo, empleando DOUBLE-REAGENTS™ Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

45 45 Por tanto, el miembro de unión específica y el agente terapéutico o marcador detectable pueden estar conectados entre sí directamente, por ejemplo, a través de cualquier enlace químico adecuado o a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico.

50 50 El enlazador peptídico puede ser uno corto (2-20, preferiblemente 2-15, residuos de aminoácidos). En la técnica se conocen ejemplos adecuados de secuencias de enlazador peptídico. Pueden usarse uno o más enlazadores diferentes. El enlazador puede tener aproximadamente 5 aminoácidos de longitud.

55 El enlace químico puede ser, por ejemplo, un enlace covalente o iónico. Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen enlaces peptídicos (enlaces amida) y enlaces disulfuro. Por ejemplo, el miembro de unión específica y el agente terapéutico o de diagnóstico pueden estar unidos covalentemente. Por ejemplo, mediante enlaces peptídicos (enlaces amida). Por tanto, el miembro de unión específica y el agente terapéutico o de diagnóstico pueden producirse (secretarse) como un polipéptido monocatenario.

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican las moléculas de anticuerpos de la

invención. El experto no tendría dificultad para preparar tales ácidos nucleicos usando métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse un ácido nucleico aislado para expresar el miembro de unión específica de la invención, por ejemplo, mediante expresión en una célula hospedadora bacteriana, de levadura, de insecto o de mamífero. Una célula hospedadora preferida es una célula de mamífero tal como una célula CHO, HEK o NS0. El ácido nucleico se proporcionará generalmente en forma de un vector recombinante para la expresión.

5 El ácido nucleico aislado puede comprender, por ejemplo, la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 99, 4, 9, 14, 19, 24, 29, 34, 39, 44 o 49, que codifican los dominios CH3 de FS18-7-9 (secuencia de nucleótidos optimizada para codones de CHO), FS18-7-9 (secuencia de nucleótidos expresada en HEK293), FS18-7-32, FS18-7-33, FS18-7-36, FS18-7-58, FS18-7-62, FS18-7-65, FS18-7-78, FS18-7-88 y FS18-7-95, respectivamente.

10 Células hospedadoras *in vitro* que comprenden tales ácidos nucleicos y vectores son parte de la invención, así como su uso para expresar los miembros de unión específica de la invención, que posteriormente pueden purificarse a partir de un cultivo celular y opcionalmente formularse en una composición farmacéutica. La presente invención proporciona además un método para producir el miembro de unión específica de la invención, que comprende cultivar la célula hospedadora recombinante de la invención en condiciones para la producción del miembro de unión específica. Los 15 métodos para cultivar células hospedadoras adecuadas como se mencionó anteriormente se conocen bien en la técnica. El método puede comprender además aislar y/o purificar el miembro de unión específica. El método también puede comprender formular el miembro de unión específica en una composición farmacéutica, opcionalmente con un excipiente farmacéuticamente aceptable u otra sustancia como se describe a continuación.

20 Se sabe que LAG-3 se expresa en células del sistema inmunitario. En particular, se sabe que LAG-3 se expresa en células T agotadas dentro del entorno tumoral, y un número limitado de células cancerosas. Además, los presentes inventores han mostrado que el uso de un miembro de unión específica que se une a LAG-3 es eficaz en la supresión del crecimiento tumoral en modelos de cáncer de ratón singénico.

25 Por tanto, un miembro de unión específica de la invención puede usarse en un método para tratar cáncer en un paciente. El paciente es preferiblemente un paciente humano. Los métodos de tratamiento no forman parte de la presente invención.

30 Las células del cáncer que van a tratarse usando el miembro de unión específica de la invención pueden expresar LAG-3, por ejemplo, en su superficie celular. En una realización, puede haberse determinado que las células del cáncer que van a tratarse expresan LAG-3, por ejemplo, en su superficie celular. Por ejemplo, se ha demostrado que los linfomas de células B expresan LAG-3 en su superficie celular. En la técnica se conocen métodos para determinar la expresión de un antígeno en una superficie celular e incluyen, por ejemplo, citometría de flujo.

35 El ejemplo 3 más adelante muestra que los miembros de unión específica de la presente invención pueden usarse para tratar tumores con altos niveles de células inmunitarias que expresan LAG-3, tales como TIL que expresan LAG-3, en ratones. Por tanto, además, o como alternativa, los tumores del cáncer que van a tratarse usando los miembros de unión específica de la invención pueden comprender células inmunitarias que expresan LAG-3. Están presentes células inmunitarias que expresan LAG-3, tales como TIL que expresan LAG-3, entre las células tumorales en muchos 40 cánceres. En una realización, se ha determinado que los tumores del cáncer que van a tratarse usando el miembro de unión específica de la invención contienen células inmunitarias que expresan LAG-3. En la técnica se conocen métodos para determinar la presencia de células inmunitarias que expresan LAG-3 en un tumor o en la periferia del tumor.

45 Un cáncer que va a tratarse usando un miembro de unión específica de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (tal como linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma indolente no Hodgkin, linfoma de células del manto), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, fibrosarcoma, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de mama, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de cabeza y cuello (tal como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer de estómago (cáncer gástrico), cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer vulvar, cáncer testicular, cáncer de pene, leucemia (tal como leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfoblástica crónica), mieloma múltiple, cáncer de células escamosas, cáncer testicular, cáncer esofágico (tal como adenocarcinoma de la unión gastroesofágica), sarcoma de Kaposi y linfoma del sistema nervioso central (SNC), carcinoma hepatocelular, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células de Merkel y mesotelioma. Se sabe, o se espera, que los tumores de estos 50 cánceres contienen células inmunitarias, tales como TIL, que expresan LAG-3.

55 El tratamiento de carcinoma de células renales, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer nasofaríngeo, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de estómago (cáncer gástrico), cáncer esofágico (tal como adenocarcinoma de la unión gastroesofágica), cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello (tal como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), leucemia (tal como leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (tal como linfoma difuso de células B grandes, linfoma indolente no Hodgkin, linfoma de células del manto) y mieloma múltiple usando anticuerpos anti-LAG-3 se ha investigado en ensayos clínicos y ha mostrado resultados prometedores. Por tanto, el cáncer que va a tratarse usando los miembros de unión específica de la presente invención puede ser un carcinoma de células renales, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer nasofaríngeo, cáncer colorrectal,

5 melanoma, cáncer de estómago (cáncer gástrico), cáncer esofágico (tal como adenocarcinoma de la unión gastroesofágica), cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello (tal como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), leucemia (tal como leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (tal como linfoma difuso de células B grandes, linfoma indolente no Hodgkin, linfoma de células del manto) o mieloma múltiple.

10 Los cánceres preferidos para el tratamiento usando los miembros de unión específica de la presente invención son cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma difuso de células B grandes, cáncer gástrico, cáncer pancreático y carcinoma hepatocelular. Se sabe que los tumores de estos cánceres comprenden células inmunitarias que expresan LAG-3 y expresan PD-L1 en su superficie celular o comprenden células inmunitarias que expresan PD-L1.

15 Cuando la solicitud se refiere a un tipo particular de cáncer, tal como cáncer de mama, se refiere a una transformación maligna del tejido relevante, en este caso un tejido de mama. Un cáncer que se origina a partir de la transformación maligna de un tejido diferente, por ejemplo tejido de ovario, puede dar como resultado lesiones metastásicas en otra ubicación en el cuerpo, tal como la mama, pero no es por ello un cáncer de mama como se denomina en el presente documento sino un cáncer ovárico.

20 El cáncer puede ser un cáncer primario o secundario. Por tanto, el miembro de unión específica de la presente invención puede ser para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el sitio de unión a antígeno basado en CDR del miembro de unión específica se une a una molécula que es un modulador del sistema inmunitario, y en donde el cáncer es un tumor primario y/o una metástasis tumoral.

25 20 Los miembros de unión específica de la invención están diseñados para usarse en métodos de tratamiento de pacientes, preferiblemente pacientes humanos. Los miembros de unión específica se administrarán habitualmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la presente invención comprende, además del principio activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable. El miembro de unión específica puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea.

30 25 Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

35 30 Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de aflicción, el miembro de unión específica, o composición farmacéutica que comprende el miembro de unión específica, está preferiblemente en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden emplearse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Los expertos en la técnica conocen muchos métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Robinson ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

40 35 Una composición que comprende miembros de unión específica según la presente invención puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, simultánea o secuencialmente o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, un miembro de unión específica de la invención puede administrarse en combinación con un agente terapéutico existente para la enfermedad que va a tratarse, por ejemplo, un cáncer como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, un miembro de unión específica de la presente invención puede administrarse al paciente en combinación con una segunda terapia anticancerígena, tal como quimioterapia, vacunación antitumoral (también denominada vacunación contra el cáncer), radioterapia, inmunoterapia, un virus oncolítico, terapia de células T con receptor de antígeno químérico (CAR) o terapia hormonal.

45 40 Se espera que el miembro de unión específica de la invención pueda actuar como adyuvante en la terapia anticancerígena, tal como quimioterapia, vacunación antitumoral o radioterapia. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la administración del miembro de unión específica al paciente como parte de la quimioterapia, vacunación antitumoral o radioterapia desencadenará una mayor respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado al cáncer LAG-3, que la que se logra con quimioterapia, vacunación antitumoral o radioterapia sola. Por ejemplo, las terapias anti-LAG-3 han mostrado buena eficacia en el tratamiento de patologías basadas en virus en ratones (Blackburn SD, et al., 2009, *Nature Immunology* 10 (1): 29-37).

50 45 Un método para tratar el cáncer en un paciente puede comprender así administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un miembro de unión específica según la presente invención en combinación con un agente quimioterápico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterápico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal. El agente quimioterápico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterápico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal es preferiblemente un agente quimioterápico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterápico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal para el cáncer en cuestión, es decir, un agente quimioterápico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterápico,

virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal que se ha demostrado que es eficaz en el tratamiento del cáncer en cuestión. La selección de un agente quimioterápico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterápico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal adecuado que se ha demostrado que es eficaz para el cáncer en cuestión está dentro de las capacidades del profesional experto.

- 5 Por ejemplo, cuando el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un miembro de unión específica según la presente invención en combinación con un agente quimioterápico, el agente quimioterápico puede seleccionarse del grupo que consiste en: taxanos, antibióticos citotóxicos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de PARP, inhibidores de la enzima B_RAF, agentes alquilantes, análogos de platino, análogos de nucleósidos, derivados de talidomida, agentes quimioterápicos antineoplásicos y otros. Los taxanos incluyen docetaxel, paclitaxel y nab-paclitaxel; los antibióticos citotóxicos incluyen actinomicina, bleomicina, antraciclinas, doxorubicina y valrubicina; los inhibidores de tirosina quinasa incluyen erlotinib, gefitinib, axitinib, PLX3397, imatinib, cobemitinib y trametinib; los inhibidores de PARP incluyen piraraparib; los inhibidores de la enzima B-Raf incluyen vemurafenib y dabrafenib; los agentes alquilantes incluyen dacarbazine, ciclofosfamida, temozolomida; los análogos de platino incluyen carboplatino, cisplatino y oxaliplatino; los análogos de nucleósidos incluyen gemcitabina y azacitidina; los antineoplásicos incluyen fludarabina. Otros agentes quimioterápicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen metotrexato, defactinib, entinostat, pemetrexed, capecitabina, eribulina, irinotecán, fluorouracilo y vinblastina.

20 Las estrategias de vacunación para el tratamiento de cánceres tanto se han implementado en la clínica como se han analizado en detalle dentro de la bibliografía científica (tal como Rosenberg, S. 2000 Development of Cancer Vaccines). Esto implica principalmente estrategias para provocar que el sistema inmunitario responda a diversos marcadores celulares expresados por células cancerosas autólogas o alogénicas usando esas células como método de vacunación, tanto con como sin factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). GM-CSF provoca una fuerte respuesta en la presentación de antígenos y funciona particularmente bien cuando se emplea con dichas estrategias.

25 La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. Por lo tanto, "tratamiento" de una enfermedad específica se refiere a la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y el transcurso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando, del paciente particular que se esté tratando, del estado clínico del paciente individual, de la causa del trastorno, del sitio de administración de la composición, del tipo de miembro de unión específica, del método de administración, de la programación de la administración y de otros factores conocidos por los profesionales médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los profesionales médicos generales y otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de una enfermedad que se está tratando. Las dosis apropiadas de miembros de unión específica se conocen bien en la técnica (Ledermann *et al.* (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; y Bagshawe *et al.* (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Pueden usarse dosificaciones específicas indicadas en el presente documento, o en el Physician's Desk Reference (2003) según sea apropiado para un miembro de unión específica que se está administrando. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un miembro de unión específica puede determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a seres humanos. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo el tamaño y la ubicación del área a tratar, y la naturaleza precisa del miembro de unión específica. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales o mensuales, a criterio del médico. El tratamiento puede administrarse antes y/o después de la cirugía, y puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

40 45 Aspectos y realizaciones adicionales de la invención, dentro del alcance de las presentes reivindicaciones, resultarán evidentes para los expertos en la técnica dada la presente divulgación que incluye la siguiente exemplificación experimental.

50 "Y/o", cuando se usa en el presente documento, debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, al igual que si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

A menos que el contexto indique lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

55 55 Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Selección y caracterización de moléculas de Fcab

1.1 Selección sin tratamiento previo y maduración de afinidad de Fcab anti-LAG-3 humana

1.1.1 Selección sin tratamiento previo

5 Se usaron bibliotecas de fagos sin tratamiento previo que presentaban el dominio CH3 de IgG1 humana (numeración de IMGT 1.4-130) con aleatorización dentro de los bucles AB (residuos 14-18) y EF (residuos 92-101) para la selección con antígeno LAG-3 humano etiquetado con Fc recombinante (LAG-3-Fc) (R&D Systems, 2319-L3-050). Las bibliotecas se seleccionaron en tres rondas usando antígeno capturado en perlas de Proteína A (Life Technologies, 10002D) o Proteína G (Life Technologies, 10004D). Las salidas se cribaron mediante ELISA y los ligantes positivos se subclonaron y expresaron como Fcab solubles (que contenían una bisagra truncada) en *Pichia pastoris* usando el kit de expresión de *Pichia* EasySelect (Life Technologies, K1740-01). Los Fcab se cribaron después para determinar la unión a LAG-3 humana-Fc recombinante en el Biacore 3000 (GE Healthcare). En resumen, se acopló LAG-3-Fc (R&D Systems, 2319-L3-050) a una densidad de 7200 RU a un chip CM5 (GE Healthcare, BR-100012) usando acoplamiento de amina (GE Healthcare, BR-1000-50). Los Fcab se diluyeron en tampón HBS-P (GE Healthcare, BR100368) y se inyectaron a 250 nM, 500 nM y 1000 nM durante 3 min y luego se dejaron disociar en tampón durante 5 min. Los datos de referencia sustraídos (celda de flujo de LAG-3-Fc 2-celda de flujo en blanco) se analizaron usando el software BIaEvaluation 3.2 para identificar la unión. Los Fcab se sometieron a prueba luego para determinar la unión a LAG-3 humana expresada en células HEK (LAG-3 clonada en el vector pCDNA5FRT [Life Technologies, V6010-20] [Véase la sección 1.4.5 para metodología]). En resumen, se separaron células HEK 293 que sobreexpresan LAG-3 humana cultivadas en DMEM (Life Technologies, 61965-026) que contenía FBS al 10 % (Life Technologies, 10270-1-6), higromicina B 100 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, Z2475), blasticidina 15 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, B1105) y desoxiciclina 1 µg/ml (Sigma, D9891) de los matraces de cultivo tisular usando tampón de disociación celular (Life Technologies, 13151-014) y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en V a 2x10⁵ células/pocillo. Los Fcab se incubaron con las células a 5 µM en un volumen de 100 µl durante 1 h a 4 °C. Las placas se lavaron, el anticuerpo secundario (anti-Fc-humano-488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) se diluyó 1:1000 en PBS y se añadieron 100 µl a las células y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Las placas se lavaron y las células se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía DAPI 1 µg/ml (Biotium, 40043). La placa se leyó en un citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando FlowJoX. Los Fcab se expresaron después en células de mamífero mediante transformación usando lipofectamina (Life Technologies, 11668-019) en células Flp-In T-Rex 293 (Life Technologies, R780-07). Los Fcab de unión a LAG-3 se sometieron a prueba para determinar la inhibición de la unión de MHC de clase II humano en células A375 (ATCC, CRL-1619) a LAG-3-Fc recombinante (usando la metodología en el ejemplo 1.6). Se identificaron 54 secuencias únicas de Fcab a partir de tres rondas de selección en fago, y se determinó que 12 de estos Fcab se unían a LAG-3-Fc mediante análisis de BIACore y/o se unían a células HEK que expresan LAG-3. Tres de los Fcab seleccionados también fueron capaces de inhibir la interacción de LAG-3 con MHC de clase II y se seleccionaron para maduración de afinidad. Los tres Fcab se denominaron FS18-3, FS18-7 y FS18-21.

1.1.2 Maduración de afinidad

Primera maduración de afinidad

40 Se construyeron seis bibliotecas de maduración de afinidad de presentación en fago aleatorizando cinco residuos en el bucle AB (residuos 14-18) y cinco (residuos 92-94 y 97-98) u ocho (residuos 92-94 y 97-101) residuos en el bucle EF de cada uno de los tres Fcab identificados usando el procedimiento de selección sin tratamiento previo descrito anteriormente.

45 Las bibliotecas de maduración de afinidad se seleccionaron usando LAG-3-humana-Fc recombinante (R&D Systems, 2319-L3-050) y células HEK que expresan LAG-3 humana (como se ha descrito anteriormente). Las salidas se cribaron mediante ELISA de fagos, los ligantes positivos se subclonaron y expresaron como Fcab solubles (que contenían una bisagra truncada) en células HEK Expi293 (Fcab clonados en el vector pTT5 [National Research Council of Canada] transfectados usando el kit de transfección ExpiFectamine 293 [Life Technologies, A14524] en células Expi293F [Life Technologies, A14527]). Los Fcab solubles expresados en HEK se cribaron después para determinar la unión a LAG-3 humana expresada en células, la unión a LAG-3 de macaco cangrejero expresada en células (metodología como el ejemplo 1.4.3) y la capacidad para bloquear la unión de MHC de clase II a LAG-3-Fc recombinante (metodología como en el ejemplo 1.6). Los Fcab bloqueantes se sometieron a prueba adicionalmente para determinar si eran capaces de revertir la inhibición inducida por LAG-3 de la secreción de IL-2 en un ensayo de activación de células T (metodología como en el ejemplo 2.1). Se identificaron 61 Fcab anti-LAG-3 únicos a partir de las seis bibliotecas de maduración de afinidad usando estos métodos de cribado. Se demostró que los Fcab madurados por afinidad del linaje FS18-7 tenían el nivel más alto de reactividad cruzada con LAG-3 de macaco cangrejero. Los tres Fcab de este linaje con la unión más fuerte a LAG-3 de macaco cangrejero-Fc y la actividad más alta en el ensayo de activación de células T (denominados FS18-7-7, FS18-7-9 y FS18-7-11) se seleccionaron para maduración de afinidad adicional. También se demostró que estos tres Fcab bloquean la interacción de LAG-3-Fc con MHC de clase II expresado en células.

Segunda maduración de afinidad

Se usó un conjunto de los tres Fcab (FS18-7-7, FS18-7-9 y FS18-7-11) de la primera maduración de afinidad para crear bibliotecas de maduración de afinidad adicionales. El bucle CD se aleatorizó intensamente usando cebadores aleatorizados de ELLA Biotech. Una porción de las posiciones de aminoácidos en el bucle CD (residuos 45.1-78) se

5 aleatorizó usando una distribución equimolar de aminoácidos excluyendo cisteína. También se llevó a cabo una PCR propensa a errores a través de la secuencia completa del dominio CH3 para introducir mutaciones adicionales que podrían potenciar la unión.

Las bibliotecas de maduración de afinidad se generaron en fagos y las selecciones se realizaron contra LAG-3-avi-Fc recombinante biotinilado (BPS Bioscience, 71147) y células HEK hLAG-3 y se criaron para determinar la unión a

10 LAG-3-Fc recombinante (R&D systems, 2319-L3-050) mediante ELISA de fagos. Se expresaron 86 Fcab únicos (que contenían una bisagra truncada) en células HEK293F. Los Fcab seleccionados también se criaron para determinar la actividad en un ensayo de activación de células T como se describió anteriormente. Los nueve Fcab identificados durante la segunda maduración de afinidad con la actividad más alta en el ensayo de activación de células T (FS18-

15 7-32; FS18-7-33; FS18-7-36; FS18-7-58; FS18-7-62; FS18-7-65; FS18-7-78; FS18-7-88; y FS18-7-95), así como el clon de Fcab parental, FS18-7-9, se caracterizaron adicionalmente después como se describe a continuación. Se muestra una alineación de secuencias de estos nueve Fcab frente al clon de Fcab parental, FS18-7-9, en la Figura

20 1A. La Figura 1B detalla el porcentaje de identidad de secuencia de cada uno de los nueve clones de Fcab con el clon de Fcab parental, FS18-7-9. Los Fcab que se originaron de la maduración de afinidad de los otros dos clones de Fcab parentales, FS18-7-7 y FS18-7-11, no eran candidatos prometedores como los que se originaron de la maduración de afinidad de FS18-7-9 y, por lo tanto, no se prosiguió adicionalmente con los mismos.

1.2 Selección de Fcab sustituto específico para LAG-3 de ratón

Fcab FS18-7, que se seleccionó usando el protocolo de selección sin tratamiento previo descrito anteriormente, se usó para generar bibliotecas de fagos para seleccionar contra LAG-3 de ratón. Se realizaron dos rondas de maduración de afinidad, y se seleccionaron los clones de Fcab FS18-7-108-29 y FS18-7-108-35, que mostraron alta afinidad, unión

25 específica a LAG-3 de ratón después de la maduración de afinidad. Se confirmó la capacidad de FS18-7-108-29 y FS18-7-108-35 para inhibir LAG-3 de ratón en un ensayo de activación de células T. El mapeo de epítopos usando el Octet (Forteo Bio) mostró que los Fcab anti-LAG-3 de ratón compiten con los Fcab anti-LAG-3 humana (seleccionados después de la segunda maduración de afinidad como se describió anteriormente) por la unión a LAG-3 humana.

30 Existen diferencias de entre 4 y 8 residuos entre los Fcab anti-LAG-3 humana y anti-LAG-3 de ratón. Por lo tanto, se espera que los Fcab anti-LAG-3 de ratón representen sustitutos adecuados para la unión y función de los Fcab anti-LAG-3 humana en ratones.

1.3 Construcción y expresión de mAb² simulado

Se prepararon mAb² "simulados" que comprendían los Fcab anti-LAG-3 humana y anti-LAG-3 de ratón líderes identificados en 1.1 y 1.2 anteriormente para permitir la caracterización de estos Fcab en el formato de mAb². Estos

35 mAb² simulados se prepararon a partir de los Fcab anti-LAG-3 y las regiones variables del anticuerpo anti-FITC 4420 (véase SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85 para detalles) (Bedzyk, W. D., *et al.* 1989 y Bedzyk, W. D., *et al.* 1990). Los mAb² simulados se prepararon tanto con (SEQ ID NO 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 y 81) como sin (SEQ ID NO 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 y 82) la mutación LALA en el dominio CH2 de la cadena pesada (véase la sección 1.5 a continuación para detalles) y comprendían además la cadena ligera del mAb anti-FITC 4420 (SEQ ID NO 85). Los mAb² simulados se produjeron mediante expresión transitoria en células HEK293-6E y se

40 purificaron usando columnas de proteína A mAb Select SuRe.

1.4 Afinidad de unión de Fcab a LAG-3

1.4.1 Afinidad de unión de Fcab a LAG-3 humana según se determina por resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se usó un BIACore T200 (GE Healthcare) para medir la afinidad de los Fcab anti-LAG-3 humana en el formato de

45 mAb² simulado para LAG-3 humana. La celda de flujo 4 de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, BR1005-30) se inmovilizó con LAG-3 humana-Fc (R&D Systems, 2319-L3-050), y la celda de flujo 3 se inmovilizó con tampón para referencia usando el kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare, BR-1000-50). Se diluyó LAG-3-Fc hasta 5 µg/ml en acetato de sodio pH 5 (ForteoBio, 18-1069) y se inyectó a un caudal de 10 µl/min durante 12 segundos seguido de desactivación de la superficie mediante inyección de etanolamina durante 420 segundos. El nivel de inmovilización

50 fue de 158 RU. Los mAb² simulados (o mAb anti-LAG-3 humana de control, 25F7) se diluyeron en tampón HBS-P (GE Healthcare, BR-1003-68) en una serie de dilución de 2 veces de 4 µg/ml. El mAb de control/mAb² simulado se

55 inyectaron con un tiempo de asociación de 240 segundos a 30 µl/min, y un tiempo de disociación de 300 segundos a 30 µl/min. La superficie se regeneró usando NaOH 25 mM durante 30 segundos a 100 µl/min. Los datos se sometieron a sustracción de referencia doble y se analizaron usando el software BIAsimulation 3.2 para calcular las constantes cinéticas. Los Fcab en formato de mAb² simulado tenía afinidades por LAG-3 humana en el intervalo de 0,8 - 1,1 nM (tabla 1), que es similar a la afinidad del mAb 25F7 anti-LAG-3 humana de referencia. Esto fue sorprendente porque los Fcab tienen una interfaz de unión más pequeña que los anticuerpos monoclonales ya que los sitios de unión de los Fcab forman un fragmento de anticuerpo relativamente compacto con dos sitios de unión situados en estrecha

proximidad. En contraste, los brazos Fab de un mAb típico están separados por una región bisagra flexible. Basándose en esta interfaz de unión más pequeña y la flexibilidad reducida asociada de los dos sitios de unión en la región Fc, fue inesperado que los Fcab anti-LAG-3 pudieran unirse a e inhibir LAG-3 con afinidad y potencia similares a las del anticuerpo de referencia 25F7.

5 Tabla 1: Afinidad de unión de Fcab específicos de LAG-3 en formato de mAb² simulado a LAG-3 humana

Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb ² simulado y mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7	K _D (M)
FS18-7-9	8,3 × 10 ⁻¹⁰
FS18-7-62	9,5 × 10 ⁻¹⁰
FS18-7-78	8,4 × 10 ⁻¹⁰
FS18-7-32	8,6 × 10 ⁻¹⁰
FS18-7-36	8,9 × 10 ⁻¹⁰
FS18-7-65	1,1 × 10 ⁻⁹
25F7	3,2 × 10 ⁻¹⁰

1.4.2 Afinidad de unión de Fcab sustituto específico para LAG-3 de ratón a LAG-3 de ratón según se determina por SPR

Se usó un Biacore 3000 (GE Healthcare) para medir la afinidad de los Fcab sustitutos específicos para LAG-3 de ratón a LAG-3 de ratón. Se usó acoplamiento de amina (kit de acoplamiento de amina, GE Healthcare, BR-1000-50) para recubrir mLAG-3-Fc (R&D Systems, 3328-L3-050) diluido en acetato de sodio 10 mM pH 5,0 (ForteBio, 18-1069) directamente a un chip CM5 (GE Healthcare, BR-1000-12). La celda de flujo 1 se recubrió con Fc de ratón (SinoBiological, 51094-MNAH), y la celda de flujo 2 se recubrió con mLALG-3-Fc a 950 RU. Los Fcab se diluyeron en tampón HBS-P (GE Healthcare, BR-1003-68) y se inyectaron a diversas concentraciones (diluciones de cuatro veces a partir de 100 nM) durante 3 min a 20 µl/min y después se dejaron disociar en tampón durante 12 min. El chip se regeneró mediante inyección de glicina 10 mM pH 2,5 durante 30 s a 30 µl/min. Los datos se sometieron a sustracción de referencia doble y se analizaron usando el software BIAevaluation 3.2 para calcular las constantes cinéticas. Los Fcab sustitutos sometidos a prueba se unieron a LAG-3 de ratón con afinidad nanomolar de un solo dígito como se establece en la tabla 2.

15 Tabla 2: Afinidad de unión (K_D) de Fcab específicos de LAG-3 sustitutos a LAG-3 de ratón

Fcab sustitutos específicos para LAG-3 de ratón	Afinidad K _D (nM)
FS18-7-108-29	1,5
FS18-7-108-35	2,1

20 1.4.3 Afinidad de unión de Fcab a LAG-3 humana expresada en células según se determina por citometría de flujo

Producción de líneas celulares que sobreexpresan LAG-3

Se usó metodología de transducción lentiviral para generar células DO11.10 (National Jewish Health) que sobreexpresan LAG-3 humana, de macaco cangrejero o de ratón usando el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX (Clontech, n.º de cat. 631249). El vector de expresión Lenti-X (pLVX) (Clontech, n.º de cat. 631253), que contenía el ADNc de LAG-3 de ratón (SEQ ID NO 96), ADNc de LAG-3 humana (SEQ ID NO 95) o ADNc de LAG-3 de macaco cangrejero (SEQ ID NO 97), se cotransfectó con una mezcla de empaquetamiento Lenti-X HTX en la línea celular Lenti-X 293T (Clontech, n.º de cat. 632180) para generar virus. La línea celular DO11.10 se transdujo usando los vectores lentivirales producidos con el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX.

25 La afinidad de los Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb² simulado a células que expresan LAG-3 humana (línea celular DO11.10 transfectada con LAG-3 humana) se midió usando citometría de flujo. Se prepararon diluciones de mAb² y mAb de control (2 x concentración final) por triplicado en 1 x DPBS (Gibco, 14190-094). Se prepararon suspensiones de células DO11.10:LAG-3 en PBS + BSA al 2 % (Sigma, A7906) y se sembraron a 4 × 10⁶ células/ml con 50 µl/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V (Costar, 3897). Se añadieron 50 µl de las diluciones de mAb² o mAb de control (mAb anti-LAG-3 humana, 25F7) a los pocillos que contenían células (volumen final 100 µl) y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (anticuerpo anti-Fc humano-488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) diluido 1:1000 en PBS + BSA al 2 % y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las placas se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de PBS

que contenía DAPI (Biotium, 40043) a 1 mg/ml. Las placas se leyeron usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de FITC (488 nm/530/30). Los datos se ajustaron usando log (agonista) frente a respuesta en el software GraphPad Prism. Todos los Fcab sometidos a prueba en formato de mAb² simulado y el mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7, se unieron a LAG-3 humana con afinidad similar (CE₅₀), en el intervalo de 1,2-2,1 nM como se expone la tabla 3.

5

Tabla 3: Afinidad de unión de Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb² simulado a células DO11.10 que expresan LAG-3 humana según se determina por citometría de flujo

Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb ² simulado y mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7	CE ₅₀ (nM)
FS18-7-9	1,2
FS18-7-32	1,6
FS18-7-33	1,5
FS18-7-36	1,5
FS18-7-62	2,1
FS18-7-65	1,6
FS18-7-78	1,7
25F7	2,1

10 1.4.4 Afinidad de unión de Fcab a LAG-3 de macaco cangrejero expresada en células según se determina por citometría de flujo

La afinidad de los Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb² simulado a células que expresan LAG-3 de macaco cangrejero (línea celular DO11.10 transfectada con LAG-3 de macaco cangrejero) se midió usando citometría de flujo. Se prepararon diluciones de mAb² y mAb de control (2 x concentración final) por triplicado en 1 x DPBS (Gibco, 14190-094). Se prepararon suspensiones de células DO11.10:LAG-3 en PBS+BSA al 2 % (Sigma, A7906) y se sembraron a 4 x 10⁶ células/ml con 50 µl/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V (Costar, 3897). Se añadieron 50 µl de las diluciones de mAb² o mAb de control (mAb anti-LAG-3 humana, 25F7) a los pocillos que contenían células (volumen final 100 µl) y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (anticuerpo anti-Fc humano-488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) diluido 1:1000 en PBS + BSA al 2 % y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las placas se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía DAPI (Biotium, 40043) a 1 mg/ml. Las placas se leyeron usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de FITC (488 nm/530/30). Los datos se ajustaron usando log (agonista) frente a respuesta en el software GraphPad Prism. Los Fcab sometidos a prueba en formato de mAb² simulado se unieron a LAG-3 de macaco cangrejero con afinidad de 0,5-0,6 nM, indicando que se esperaría que estudios de toxicología en macacos cangrejeros fueran predictivos de los efectos observados en seres humanos (véase la tabla 4). El mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7, se une a LAG-3 de macaco cangrejero con una afinidad (CE₅₀) 15 veces peor (tabla 4).

15 20 25

Tabla 4: Afinidad de unión de Fcab anti-LAG-3 a células DO11.10 que expresan LAG-3 de macaco cangrejero por citometría de flujo

Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb ² simulado y mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7	CE ₅₀ (nM)
FS18-7-9	0,6
FS18-7-62	0,5
FS18-7-78	0,5
25F7	9,0

1.4.5 Afinidad de unión de Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos y Fcab anti-LAG-3 humana a LAG-3 de ratón expresada en células según se determina por citometría de flujo

Producción de células HEK que sobreexpresan mLAG-3

La secuencia de LAG-3 de ratón (SEQ ID NO 96) se subclonó en el vector pcDNA5FRT (Life Technologies, V6010-20) usando digestión por restricción con KpnI (NEB, R0142) y NotI (NEB, R0146). El vector se transformó después en la línea celular Flp-In T-REx 293 HEK (Life Technologies, R780-07) usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies, 11668-019). Se cultivaron células Flp-In T-REx 293 transformadas en DMEM (Life Technologies, 61965-026) que contenía FBS al 10 % (Life Technologies, 10270-1-6), higromicina B 100 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, Z2475), blasticidina 15 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, B1105) durante 3-4 semanas hasta que fueron evidentes colonias de células transformadas de manera estable. Estas colonias se amplificaron en presencia de doxiciclina 1 µg/ml (Sigma, D9891) y se sometieron a prueba para determinar la expresión de LAG-3 de ratón usando anticuerpo anti-LAG-3 de ratón conjugado con PE (clon C9B7W, BD Biosciences, 552380).

La afinidad de los Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos (que contienen la bisagra truncada) a LAG-3 de ratón expresada en células se determinó usando citometría de flujo. Se separaron células HEK que expresan mLAG-3 cultivadas en DMEM (Life Technologies, 61965-026) que contenía FBS al 10 % (Life Technologies, 10270-1-6), higromicina B 100 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, Z2475), blasticidina 15 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, B1105) y doxiciclina 1 µg/ml (Sigma, D9891) de los matraces de cultivo tisular usando tampón de disociación celular (Life Technologies, 13151-014) y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar, 3897) a 2×10^5 células/pocillo. Las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min a 4 °C para sedimentar las células. Se incubó una serie de dilución de los Fcab (o mAb de control) con las células en un volumen de 100 µl durante 1 h a 4 °C. Las placas se lavaron y se diluyó anticuerpo secundario (anti-Fc humano-488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098 para Fcab o anti-IgG de rata (H+L), conjugado Alexa Fluor 488, ThermoFisher, A-1106 para C9B7W) 1:1000 en PBS y se añadieron 100 µl a las células durante 30 min a 4 °C (las placas se mantuvieron en la oscuridad). Las placas se lavaron a continuación y las células se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía DAPI 1 µg/ml (Biotium, 40043). Las placas se leyeron usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de FITC (488 nm/530/30). Los datos se ajustaron usando log (agonista) frente a respuesta en el software GraphPad Prism. Los Fcab sometidos a prueba se unieron a LAG-3 de ratón con afinidad similar (véase la tabla 5). El mAb de LAG-3 de referencia, C9B7W (2B Scientific, BE0174-50MG), se une a LAG-3 de ratón con una afinidad (CE₅₀) 17 veces peor que los Fcab (tabla 5).

30 Tabla 5: Afinidad de unión de Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos a células HEK que expresan LAG-3 de ratón por citometría de flujo

Fcab anti-LAG-3 de ratón y mAb anti-LAG-3 de ratón de referencia, C9B7W	CE ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	4,5
FS18-7-108-35	4,5
C9B7W	79

35 La afinidad del Fcab anti-LAG-3 humana FS18-7-9 en formato de mAb² simulado a LAG-3 de ratón expresada en células se determinó usando citometría de flujo. Se separaron células HEK que expresan mLAG-3 cultivadas en DMEM (Life Technologies, 61965-026) que contenía FBS al 10 % (Life Technologies, 10270-1-6), higromicina B 100 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, Z2475), blasticidina 15 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, B1105) y doxiciclina 1 µg/ml (Sigma, D9891) de los matraces de cultivo tisular usando tampón de disociación celular (Life Technologies, 13151-014). Las células se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 3 min a 4 °C para sedimentar las células y luego se resuspendieron en 1 x DPBS y luego se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar, 3897) a $1,2 \times 10^5$ células/pocillo en 30 µl. Se añadió un volumen 1:1 de una serie de dilución del mAb² (o mAb de control) y se incubó con las células durante 1 h a 4 °C. Las placas se lavaron y se diluyó el anticuerpo secundario (anti-Fc humano-488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) 1:1000 en PBS y se añadieron 60 µl a las células durante 30 min a 4 °C (las placas se mantuvieron en la oscuridad). Las placas se lavaron a continuación y las células se resuspendieron en 60 µl de PBS que contenía DAPI 1 µg/ml (Biotium, 40043). Las placas se leyeron usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de FITC (488 nm/530/30). Los datos se ajustaron usando log (agonista) frente a respuesta en el software GraphPad Prism.

40 El Fcab anti-LAG-3 humana FS18-7-9 en formato de mAb² simulado se unió a LAG-3 de ratón con una CE₅₀ de 19 nM en comparación con una CE₅₀ de 2,6 nM para el Fcab anti-LAG-3 de ratón sustituto FS18-7-9-108 (tabla 6). El mAb humano, 25F7 no muestra ninguna unión detectable a LAG-3 de ratón, indicando que el Fcab de LAG-3 humana, FS18-7-9, tiene un epítopo de unión diferente en LAG-3 al de 25F7.

Tabla 6: Afinidad de unión de Fcab anti-LAG-3 humana FS18-7-9 a células HEK que expresan LAG-3 de ratón por citometría de flujo

Fcab anti-LAG-3 humana, Fcab anti-LAG-3 de ratón y mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7	CE ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	2,6
FS18-7-9	19
25F7	Sin unión

1.5 Afinidad de unión de Fcab a receptores de Fc

5 Se sabe que la introducción de la mutación LALA en el dominio CH2 de IgG1 humana reduce la unión al receptor de Fc y (Bruhns, P., *et al.* (2009) y Xu, D. *et al.* (2000)). Se usó BIACore para confirmar que la mutación LALA había reducido la afinidad de unión de los Fcab (en formato de mAb² simulado) a receptores de Fcγ. El ensayo de unión a 10 FcγR humano se realizó en un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) usando los Fcab en el formato de mAb² simulado. Los FcγR humanos (R&D Systems, 1257-FC, 1330-CD, 1875-CD, 4325-FC) se inmovilizaron usando 15 acoplamiento de amina (kit de acoplamiento de amina, GE Healthcare, BR-1000-50) sobre un chip SCM5 de la serie S (GE Healthcare, BR-1005-30) a una densidad superficial de 370 RU para FcγRI, 264 RU para FcγRIII (FcγR humanos de alta afinidad) y 500 RU para FcγRIIa y FcγRIIb (FcγR humanos de baja afinidad). Para cada chip inmovilizado, se dejó una celda de flujo en blanco para la sustracción del fondo. Se inmovilizaron FcγR usando una concentración de 5 µg/ml en acetato de sodio pH 5 (ForteBio, 18-1069) y se inyectaron a un caudal de 10 µl/min en ciclos de 15 segundos hasta que se alcanzó el nivel de inmovilización requerido.

Para el FcγRI y FcγRIII de alta afinidad, se hicieron fluir 200 µg/ml de mAb o mAb² simulado a través del chip durante 3 min a una velocidad de flujo de 30 µl/min y se siguió la disociación durante 5 min. El tampón de ejecución fue HBS-P (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 % v/v, GE Healthcare, BR-1003-68). Para el FcγRIIa y FcγRIIb de baja afinidad, la concentración de mAb² simulado se aumentó hasta 500 µg/ml.

20 El control positivo fue un mAb de isotipo IgG1 de tipo silvestre, que se comparó con los controles mAb IgG1 LALA e mAb de isotipo IgG2 e IgG4 monoclonales frente a dianas irrelevantes. Las celdas de flujo se regeneraron inyectando hidróxido de sodio 10 mM (VWR, 28244.262) a un caudal de 100 µl/min durante 30 segundos. El análisis de datos se realizó con el software BiaEvaluation versión 3.2 RC1 mediante referencia doble contra la celda de flujo en blanco (sin FcγR inmovilizado) y restando un ciclo de tampón del mAb² de prueba. Los resultados se muestran en la tabla 7.

25 Tabla 7: Respuesta de unión de Fcab anti-LAG-3 humana en formato de mAb² simulado (que comprende la mutación LALA como se detalló anteriormente) a receptores de Fcγ humanos por SPR

mAb/mAb ² simulado	Respuesta de unión al final de la asociación (RU)			
	FcγRI	FcγRIII	FcγRIIa	FcγRIIb
FS18-7-9	1,4	6,6	-9,8	-8,5
FS18-7-62	-0,9	0,7	-10	-8,5
FS18-7-78	-0,3	4,0	-10,7	-9,2
mAb simulado LALA	2	8,0	-12,7	-9,6
IgG2	0	1,9	9,7	7,4
IgG4	9	3,1	4,3	15,1
mAb simulado IgG1	26	44	13	17,7

30 Todos los mAb² simulados sometidos a prueba (comprendiendo todos la mutación LALA como se estableció anteriormente) mostraron una unión significativamente reducida a los receptores de Fcγ sometidos a prueba en comparación con el anticuerpo de control (mAb simulado IgG1) sin la mutación LALA, lo que indica que la mutación LALA ha reducido la unión al receptor de Fcγ por estos mAb² simulados y, por lo tanto, se espera que se reduzca la actividad de ADCC del mAb².

1.6 Bloqueo de la unión de MHC de clase II a LAG-3

La capacidad de los Fcab (que contienen la bisagra truncada; SEQ ID NO: 58) para bloquear la interacción entre LAG-

- 3 humana o de ratón-Fc recombinante y MHC de clase II humano se estudió midiendo la unión de LAG-3-Fc a células A375, una línea celular de melanoma que expresa MHC de clase II humano. Se separaron células A375 (ATCC, CRL-1619) cultivadas en DMEM (Life Technologies, 61965-026) que contenía FBS al 10 % (Life Technologies, 10270-106) de los matraces de cultivo celular usando tampón de disociación celular (Life Technologies, 13151-014) y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar, 3897) a 2×10^5 células/pocillo. Las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min a 4 °C para sedimentar las células. Las concentraciones relevantes de Fcab o mAb de control se incubaron con LAG-3-Fc 1 µg/ml (LAG-3 humana-Fc R&D Systems, 2319-L3-050 o LAG-3 de ratón-Fc R&D Systems, 3328-L3-050) en 100 µl de DMEM que contenía FBS al 10 % durante 1 h a 4 °C. Se añadió mezcla de LAG-3/Fcab a las células A375 y se incubó durante 1 h a 4 °C. Las células se lavaron. Se diluyó anticuerpo secundario (F(ab')₂ anti-Fc humano de cabra conjugado con Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098 o conjugado de cabra anti-IgG de ratón (H+L) 488, Life Technologies, A-1101) 1:1000 en PBS y se añadieron 100 µl a las células durante 30 min a 4 °C (las placas se mantuvieron en la oscuridad). Las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en 100 µl de PBS + DAPI 1 µg/ml (Biotium, 40043). Las placas se leyeron en un citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando el software FlowJo.
- 5 Ambos Fcab anti-LAG-3 de ratón fueron capaces de inhibir la interacción de MHC de clase II humano con LAG-3 de ratón, mientras que el mAb anti-LAG-3 de ratón de control (C9B7W, 2B Scientific, BE0174-50MG) no lo fue (véase la tabla 8).

Tabla 8: Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos inhiben la unión de LAG-3 de ratón a MHC de clase II

Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos y mAb anti-LAG-3 de ratón de control C9B7W	Cl ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	0,6
FS18-7-108-35	0,7
C9B7W	Sin bloqueo

- 20 Los Fcab anti-LAG-3 humanas sometidos a prueba también fueron capaces de inhibir la interacción de MHC de clase II humano con LAG-3 humana con una potencia similar a la del mAb anti-LAG-3 humana de control (25F7).

Tabla 9: Fcab anti-LAG-3 humana inhiben la unión de LAG-3 humana a MHC de clase II

Fcab anti-LAG-3 humana y mAb anti-LAG-3 humana de control 25F7	Cl ₅₀ (nM)
FS18-7-108-33	2,6
FS18-7-108-78	2,4
25F7	3,6

Ejemplo 2 - Actividad de moléculas Fcab en ensayos de activación de células T DO11.10

25 2.1 Actividad de Fcab líderes en un ensayo de activación de células T DO11.10 LAG-3 humana

El panel de Fcab líderes (con una bisagra truncada; SEQ ID NO: 58) que contenían la mutación LALA se sometieron a prueba en un ensayo de activación de células T basado en DO11.10.

Medios de cultivo celular y péptido:

- Medio de cultivo celular de DO11.10: DMEM (Gibco, 61965-026) FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070), puromicina 1 µg/ml (Gibco, A11138-03)
- Medio experimental: medio de cultivo de DO11.10 completo sin puromicina.
- Medios de cultivo celular de A20: RPMI (Gibco, 61870-010) FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070)
- Péptido OVA (PM = 1773,9 Da): H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH (Pepscan)

35 Células:

- DO11.10 hLAG-3: Células T DO11.10 transducidas con un vector lentiviral para sobreexpresar LAG-3 humana (como anteriormente)
- A20: Línea de linfoma de células B de BALB/c que expresa MHC de clase II (ATCC, TIB-208)

Se prepararon diluciones de Fcab o mAb de referencia en 200 µl de medio experimental. Los Fcab se mezclaron 1:1 (170 µl + 170 µl) con 4x10⁵/ml de células DO11.10 LAG-3 en medio experimental y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 1 hora. Se incubaron 2x10⁵ células A20/ml de medio experimental con péptido OVA 1 µM durante 30 minutos. Se añadieron 360 µl de la mezcla de células A20 + OVA a 360 µl de la mezcla de células DO11.10 LAG-3/Fcab. Las células se mezclaron después en una placa de pocillos profundos y se cultivaron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos con 200 µl de la mezcla/pocillo. El ensayo se realizó por triplicado. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron a ensayo con el kit de ELISA de IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-88 o R&D systems, SM2000) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gen5, BioTek. Los valores de absorbancia de 570 nm se restaron de los de 450 nm (corrección). La curva patrón para el cálculo de la concentración de citocinas se basó en un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (software Gen5, BioTek). La concentración de mIL-2 se representó frente al logaritmo de la concentración de Fcab o de mAb de referencia y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Valores de CE₅₀ de Fcab anti-LAG-3 humana en el ensayo de activación de células T DO11.10

Fcab anti-LAG-3 humana (con mutación LALA) y mAb anti-LAG-3 humana de referencia, 25F7	CE ₅₀ (nM)
FS18-7-95	0,8
FS18-7-78	1,0
FS18-7-62	1,1
FS18-7-33	1,1
FS18-7-65	1,1
FS18-7-9	1,2
FS18-7-36	1,3
FS18-7-58	1,3
FS18-7-88	1,3
FS18-7-32	1,7
25F7	2,2

Los Fcab líderes humanos muestran una actividad significativa en el ensayo de activación de células T con potencias en el intervalo de 1-2 nM. Los Fcab tienen una potencia ligeramente mejorada que el mAb anti-LAG-3 humana de referencia 25F7. Se espera que la potencia mejorada en el ensayo de activación de células T sea predictiva de una eficacia mejorada en pacientes humanos a través de la inhibición potenciada de LAG-3.

2.2 Actividad de Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos en un ensayo de activación de células T DO11.10 LAG-3 de ratón

Los Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos (con una bisagra truncada; SEQ ID NO: 58) que contenían la mutación LALA se sometieron a prueba en un ensayo de activación de células T basado en DO11.10.

Medios de cultivo celular y péptido:

- Medio de cultivo celular de DO11.10: DMEM (Gibco, 61965-026) FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070), puromicina 1 µg/ml (Gibco, A11138-03)
- Medio experimental: medio de cultivo de DO11.10 completo sin puromicina.
- Medios de cultivo celular de A20: RPMI (Gibco, 61870-010) FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070)
- Péptido OVA (PM = 1773,9 Da): H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH (Pepscan)

Células:

- DO11.10 mLAG-3: Células T DO11.10 transducidas con un vector lentiviral para sobreexpresar LAG-3 de ratón (como anteriormente)

- A20: Línea de linfoma de células B de BALB/c que expresa MHC de clase II (ATCC, TIB-208)

Se prepararon diluciones de Fcab o mAb de referencia en 200 μ l de medio experimental. Los Fcab se mezclaron 1:1 (170 μ l + 170 μ l) con 4x10⁵/ml de células DO11.10 LAG-3 en medio experimental y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 1 hora. Se incubaron 2x10⁵ células A20/ml de medio experimental con péptido OVA 1 μ M durante 30 minutos.

5 Se añadieron 360 μ l de la mezcla de células A20 + OVA a 360 μ l de la mezcla de células DO11.10 LAG-3/Fcab. Las células se mezclaron después en una placa de pocillos profundos y se cultivaron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos con 200 μ l de la mezcla/pocillo. El cribado se sometió a ensayo por triplicado. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron a ensayo con el kit de ELISA de IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-88 o R&D systems, SM2000) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gen5, BioTek. Los valores de absorbancia de 570 nm se restaron de los de 450 nm (corrección). La curva patrón para el cálculo de la concentración de citocinas se basó en un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (software Gen5, BioTek). La concentración de mIL-2 se representó frente al logaritmo de la concentración de Fcab o de mAb de referencia y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la tabla 11 y la Figura 2.

10

15

Tabla 11: Valores de CE₅₀ y liberación de IL-2 máxima de Fcab anti-LAG-3 sustitutos en el ensayo de activación de células T DO11.10

Fcab sustitutos específicos para LAG-3 de ratón (con mutación LALA) y mAb anti-LAG-3 de ratón de referencia, C9B7W	CE ₅₀ (nM)	Liberación de IL-2 máxima (pg/ml)
FS18-7-108-29	1,9	205
FS18-7-108-35	1,8	176
C9B7W	5,1	48

20 Los Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos mostraron actividad significativa en el ensayo de activación de células T con potencias en el intervalo de 2 nM. Los Fcab anti-LAG-3 de ratón sustitutos tenían mayor potencia que el anticuerpo anti-LAG-3 de ratón de referencia, como es evidente a partir de la CE₅₀ mejorada y la activación máxima 4 veces mayor de la liberación de IL-2. Se espera que la potencia y la activación máxima mejoradas de estos Fcab en comparación con el producto de referencia dé como resultado una actividad mejorada en estudios de eficacia murina en comparación con el producto de referencia a través de la inhibición mejorada de LAG-3.

25 *2.3 Actividad de FS18-7-9 en formato de mAb² simulado en un ensayo de activación de células T DO11.10 LAG-3 de macaco cangrejero*

Uno de los Fcab líderes, FS18-7-9, se sometió a prueba en un ensayo de activación de células T basado en DO11.10 LAG-3 de macaco cangrejero en el formato de mAb² simulado que comprende la mutación LALA descrita anteriormente.

30 Medios de cultivo celular y péptido:

- Medio de cultivo celular de DO11.10: DMEM (Gibco, 61965-026) FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070), puromicina 1 μ g/ml (Gibco, A11138-03)
- Medio experimental: medio de cultivo de DO11.10 completo sin puromicina.
- Medios de cultivo celular de A20: DMEM (Gibco, 61965-026) FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070), puromicina 1 μ g/ml (Gibco, A1 1138-03)
- Péptido OVA (PM = 1773,9 Da): H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH (Pepscan)

Células:

- DO11.10 cynoLAG-3: células T DO11.10 transducidas con un vector lentiviral para sobreexpresar LAG-3 de macaco cangrejero (como anteriormente)
- LK 35.2 PLVX: hibridoma de células B transducido con un vector lentiviral vacío (pLVX);

40 Se prepararon diluciones del Fcab FS18-7-9 en formato de mAb² simulado (FS18-7-9/4420LALA) o mAb de referencia en medios experimentales. Se mezclaron células DO11.10 (0,3 x 10⁶ células/ml) en una proporción 1:1 con anticuerpos a 3 x concentración final. Los anticuerpos y las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 1 hora. Se incubaron células LK 35.2 a 3x10⁵ células/ml de medio experimental con el péptido OVA a 1,5 μ M durante 30 minutos. Se añadieron 70 μ l de células LK 35.2 + OVA a 140 μ l de DO11.10/anticuerpo. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de

5 CO₂ durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron a ensayo con el kit de ELISA de IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-88 o R&D systems, SM2000) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gen5, BioTek. Los valores de absorbancia de 570 nm se restaron de los de 450 nm (corrección). La curva patrón para el cálculo de la concentración de citocinas se basó en un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (software Gen5, BioTek). La concentración de mIL-2 se representó frente al logaritmo de la concentración de Fcab en formato de mAb² simulado o mAb de referencia y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación log (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la tabla 12 y la Figura 3.

10 Tabla 12: Valores de CE₅₀ y liberación de IL-2 máxima de Fcab anti-LAG-3 en el ensayo de activación de células T DO11.10 de macaco cangrejero

Fcab FS18-7-9 en formato de mAb ² simulado o mAb anti-LAG-3 humana de referencia	CE ₅₀ (nM)	Liberación de IL-2 máxima (pg/ml)
FS18-7-9/4420LALA	5,6	608
25F7	11,4	430

15 El Fcab FS18-7-9 en formato de mAb² simulado mostró actividad significativa en el ensayo de activación de células T con una potencia de 5,6 nM. Específicamente, el Fcab FS18-7-9 en formato de mAb² simulado tenía mayor potencia contra LAG-3 de macaco cangrejero que el anticuerpo anti-LAG-3 humana de referencia, como es evidente a partir de la CE₅₀ mejorada y la activación máxima más alta de la liberación de IL-2. En comparación con el producto de referencia, la CE₅₀ y activación máxima del Fcab en formato de mAb² simulado en LAG-3 humana y de macaco cangrejero, según se determina usando un ensayo de activación de células T, es más similar (el producto de referencia tiene una CE₅₀ inferior en LAG-3 de macaco cangrejero que el Fcab pero tiene una CE₅₀ similar en LAG-3 humana en el ensayo de activación de células T). Por lo tanto, se espera que los resultados de estudios en macacos cangrejeros usando los Fcab, por ejemplo, en formato de mAb² simulado, será más predictivo de la respuesta en pacientes humanos. Por ejemplo, si una mayor potencia dio como resultado una mayor toxicidad, se espera que esto se observe cuando se realicen pruebas en un modelo de macaco cangrejero, mientras que en una molécula con menor potencia en macacos cangrejeros que en seres humanos no se observaría esto antes de comenzar los ensayos en pacientes humanos.

20 25 Ejemplo 3 - Eficacia antitumoral *in vivo* de Fcab en formato de mAb²

3.1 Preparación de mAb² para pruebas *in vivo* en ratones

30 Se prepararon moléculas de mAb² que comprendían el Fcab anti-LAG-3 de ratón sustituto, FS18-7-108-29. Las moléculas de mAb² comprendían una región Fab específica para CD73 murino (TY11.8), TIM-3 murino (RMT3-23), CSF-1R murino (AFS98) o CLTA-4 murino (9D9), y se sometieron a prueba para determinar la actividad antitumoral *in vivo* usando un modelo de crecimiento tumoral de ratón singénico MC38. Las secuencias de Fab se obtuvieron como sigue:

Anticuerpo de rata anti-TIM-3 de ratón

Nombre del clon - RMT3-23

Referencia - Nakayama, M *et al*, 2009

35 40 Anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón

Nombre del clon - 9D9

Referencia - Solicitud de patente US 2011/0044953 A1

Anticuerpo de rata anti-CSF-1R de ratón

Nombre del clon - AFS98

45 40 Referencia - Sudo T, *et al* 1995

Anticuerpo de rata anti-CD73 de ratón

Nombre del clon - TY11.8

Referencia - Yamashita, Y. *et al* 1998

45 Para producir los anticuerpos de control para los experimentos *in vivo*, las regiones pesadas variables de cada una de las fuentes anteriores se unieron a las regiones constantes de IgG1 humana (G1m17), las regiones ligeras variables

de cada una de las fuentes anteriores se unieron a la región constante humana (Km1) a través de la región J kappa 1 humana (excepto 9D9 donde se usó la región J kappa 1 de ratón). Los mAb² para los estudios *in vivo* se generaron sustituyendo los dominios CH3 de los constructos reformateados descritos anteriormente con FS18-7-108-29.

3.2 Actividad de mAb² en un modelo de tumor singénico MC38

5 El modelo de tumor singénico MC38 se usó en este experimento ya que se sabe que los tumores MC38 son altamente inmunogénicos dando como resultado una expresión aumentada de LAG-3 en células inmunitarias en el entorno tumoral y la periferia tumoral.

10 Se dejaron descansar ratones hembra C57BL/6 (Charles River) de 8-10 semanas de edad y que pesaban 20-25 g cada uno durante una semana antes del inicio del estudio. A todos se les puso un microchip y se les administró un identificador único. Cada cohorte tenía 10 ratones. La línea celular de carcinoma de colon MC38 (S. Rosenberg, NIH) se expandió inicialmente, se almacenó y después se sometió a cribado previo por IDEXX Bioreserach para detectar patógenos usando el protocolo IMPACT I y se mostró que estaba libre de patógenos. Las células MC38 se descongelaron a partir del almacenamiento a -150 °C y se añadieron a 20 ml de DMEM (Gibco, 61965-026) con FCS al 10 % (Gibco, 10270-106) en un matraz de cultivo tisular T175. Cada animal recibió 2x10⁶ células inyectadas por vía subcutánea en el costado izquierdo. 7-8 días después de la inoculación de células tumorales, se retiraron del estudio ratones que no tenían tumores en este punto. Todas las moléculas de mAb² y el anticuerpo de control se analizaron dentro de las 24 horas anteriores a la inyección mediante la obtención del perfil de SEC-HPLC y se comprobó la presencia de impurezas.

15 20 Las moléculas de mAb² y el anticuerpo de control se inyectaron en ratones a una concentración final de 10 mg/kg en PBS. Cada ratón recibió mAb² o mezcla de anticuerpos de control mediante inyección intraperitoneal (IP) los días 8, 11 y 14 después de la inoculación del tumor. Se tomaron mediciones precisas de los tumores, se realizó cualquier dosificación de fármaco debida el día en cuestión, y los ratones se sometieron a observación estrecha durante el resto del ensayo. Se tomaron mediciones de volumen tumoral con calibres para determinar el eje más largo y el eje más corto del tumor. Se usó la siguiente fórmula para calcular el volumen tumoral:

$$25 \quad L \times (S^2) / 2$$

donde L = eje más largo; S = eje más corto

El ensayo se detuvo el día 25 cuando la carga tumoral se consideró cercana a las restricciones.

30 Como se muestra en la Figura 4, todas las moléculas de mAb² sometidas a prueba mostraron inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con el control de IgG. El estudio muestra que, en ratones con un sistema inmunitario completamente funcional, la inhibición de LAG-3 en combinación con la inhibición con TIM-3, CSF-1R, CTLA-4 o CD73 conduce a una reducción en el crecimiento tumoral, presumiblemente a través de un aumento de la actividad del sistema inmunitario. Los modelos de ratón singénicos se aceptan como sistemas murinos apropiados para someter a prueba el efecto antitumoral de inhibir dianas terapéuticas y se han usado ampliamente para validar el desarrollo de agentes terapéuticos humanos. Se ha demostrado que la inhibición de CTLA-35 4 da como resultado un aumento de la sensibilización de células T en los ganglios linfáticos. Una vez sensibilizada, la célula T migra al microentorno tumoral donde el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 potencia la activación de la célula T sensibilizada, dando como resultado efectos antitumorales sinérgicos de la combinación de anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1. Esto se refleja en el aumento de la eficacia de la combinación de PD-1 y CTLA-4 en la clínica. Se plantea la hipótesis de que la profunda inhibición tumoral causada por el mAb² frente a LAG-3/CTLA-4 en el modelo de tumor singénico MC38 es a través de una sinergia similar; la inhibición de la sensibilización de células T que aumenta CTLA-40 4 y la inhibición de la activación de células T que aumenta LAG-3 en el sitio del tumor. El efecto más modesto de la inhibición doble de LAG-3 y TIM-3 puede atribuirse a que LAG-3 y TIM-3 suprimen células T agotadas con un modo de acción similar. Estas son señales secundarias que se expresan después de que PD-1 esté en células T. Con la inhibición de PD-1 todavía retenida, la inhibición de TIM-3 y LAG-3 solo puede lograr resultados leves.

45 50 55 Los macrófagos son críticos para mantener un entorno tumoral inmunosupresor. La selección como diana de CSF-1R da como resultado una disminución en macrófagos asociados a tumores debido a la inhibición de la diferenciación de macrófagos y la eliminación de señales de supervivencia. Se plantea la hipótesis de que la profunda inhibición tumoral causada por el mAb² frente a LAG-3/CSF-1R en el modelo de tumor singénico MC38 es a través de sinergia resultante de una liberación de la inmunosupresión inducida por macrófagos en el entorno tumoral que permite que los anticuerpos frente a LAG-3 aumenten la activación de células T en el sitio tumoral. En la clínica están evaluándose ya combinaciones de CSF-1R e inhibidores de puntos de control, lo que ayudará a informar de la viabilidad de combinar CSF-1R con la inhibición de LAG-3. El bloqueo de CD73 también da como resultado la inhibición de macrófagos, sin embargo, el efecto supresor tumoral intermedio del mAb² frente a CD73/LAG-3 sugiere que anti-CD73 puede ser un inhibidor de macrófagos menos potente. Puesto que los Fc_{ab} anti-LAG-3 de ratón sustitutos están tan estrechamente relacionados en secuencia con los Fc_{ab} anti-ser humano (y se derivaron del mismo Fc_{ab} anti-LAG-3 humana parental), ambos se unen a un epítopo muy similar de LAG-3 (de ratón y humana, respectivamente) a pesar de la diferencia en homología entre LAG-3 humana y murina. Por consiguiente, se espera que los resultados observados en ratones después de su tratamiento con mAb² que comprende el Fc_{ab} anti-LAG-3 de ratón sustituto sean predictivos del

tratamiento de pacientes humanos con mAb² que comprende el Fcab anti-LAG-3 humana.

Ejemplo 5: Efecto del tratamiento con Fcab sobre la expresión de LAG-3 de células T

Se sometió a prueba el efecto del LAG-3/mAb² simulado, FS18-7-108-29/4420 que contiene la mutación LALA (SEQ ID NO: 132 y 85), denominado FS18-29/4420, el mAb frente a PD-L1 de referencia S1 que contiene la mutación LALA (SEQ ID NO: 122 y 119) y una combinación de FS18-29/4420 y S1, sobre la expresión de LAG-3 de TIL.

El día del implante, se recogieron células MC38.OVA cultivadas durante el crecimiento en fase logarítmica (confluencia ~75 %) y se resuspendieron en PBS a una concentración de 1×10^7 células/ml. Los tumores se iniciaron anestesiando en primer lugar cada animal con isoflurano, después implantando por vía subcutánea 1×10^6 células MC38.OVA (suspensión de 0,1 ml) en el costado izquierdo de cada animal de prueba. Once días después de la implantación de células tumorales, los animales se aleatorizaron, usando un método de aleatorización determinista, en cinco grupos con volúmenes tumorales individuales de 32 a 62,5 mm³. Los animales se dosificaron a 10 mg/kg de anticuerpo o mAb² los días 12, 14 y 16 después de la inoculación del tumor, y se recogieron tumores de tres animales/grupo los días 19 y 23 después de la inoculación del tumor. Se usó un disociador GentleMACS™ para disociar el tumor con las células tamizadas posteriormente a través de un filtro de células de 70 µm para obtener una suspensión de células individuales. Se resuspendieron 1×10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en tampón FACS con tinción de viabilidad 1:3000 y bloqueo de Fc (anticuerpo anti-CD16/32). Las células para el análisis de FACS se tiñeron usando una mezcla maestra que incluía anticuerpos marcados contra CD43, CD8a, CD4, FoxP3 y LAG-3. Para la tinción intracelular de FoxP3, las células se fijaron y permeabilizaron antes de la tinción con el anticuerpo contra FoxP3. Las muestras se procesaron en el citómetro de flujo Canto II con una matriz de compensación y se contaron un mínimo de 500.000 acontecimientos.

En este experimento, se examinó la expresión de LAG-3 en los TIL después de la tercera dosis de anticuerpo/mAb² simulado, cuando se observó una separación en el crecimiento del tumor entre los tratamientos de control y no de control, pero antes de que hubiera una gran diferencia entre los tamaños del tumor que podrían sesgar los resultados. En este momento, se encontró que la expresión de LAG-3 en los TIL estaba notablemente disminuida en animales tratados con la combinación de FS18-29/4420 y S1. Específicamente, como se muestra en la Figura 5, La expresión de LAG-3 en los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) con CD8, CD4 y FoxP3 disminuyó después del tratamiento con una combinación de FS18-29/4420 y S1 el día 23, mientras que el tratamiento con FS18-29/4420 o S1 administrado individualmente tuvo poco o ningún efecto sobre la expresión de LAG-3 en TIL.

Estos resultados muestran que se requiere una inhibición doble de LAG-3 y PD-L1 para una disminución en la expresión de LAG-3 por TIL, ya que este fenómeno no se observó en animales tratados con agentes individuales contra LAG-3 o PD-L1. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el tratamiento doble con anti-LAG-3 y anti-PD-L1 conduce a una disminución en la expresión de LAG-3 en TIL, reduciendo así el efecto inhibidor de LAG-3 y permitiendo que los TIL superen el agotamiento. Una vez que los TIL se activan, se espera que sean capaces de reconocer los neoantígenos expresados por el tumor y de generar una respuesta contra el mismo, y reducir así la carga tumoral.

Listado de secuencias

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-9

Bucle AB de FS18-7-9 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

Bucle CD de FS18-7-9 - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 2)

40 Bucle EF de FS18-7-9 - PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-9 (SEQ ID NO: 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCCTGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTCCTCTACAGCAAGCTACCCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Secuencia de nucleótidos optimizada para codones de CHO del dominio CH3 de Fcab FS18-7-9 (SEQ ID NO: 99)

GGCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCTGGGATGAGCCCTGGGCGA
GGATGTGTCCTGACCTGTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATGCCGTGGAATGGGAG
AGCAACGGCCAGCCCAGAACAACATACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGCCTACGACAGATGGGTGTGGCCCGACGAGTTCTCCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCTGAGCCCCG
GC

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-9 (SEQ ID NO: 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGVEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-9, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 6)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-9 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

10 Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-32

Bucle AB de FS18-7-32 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

Bucle CD de FS18-7-32 - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 8)

Bucle EF de FS18-7-32 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-32 (SEQ ID NO: 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCTGCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGAAATGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGCCGTATGATAGGTGGTTGCCGGATGAGTTCTCATG
15 CTCCTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGAAGAGCCTCCCTGTCTCCGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-32 (SEQ ID NO: 10)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGVEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-32, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 11)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM
20 HEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-32 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 12)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPGEDVS
 LTCLVKGFYPSEIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-33

Bucle AB de FS18-7-33 - WDEPGED (SEQ ID NO: 1)

5 Bucle CD de FS18-7-33 - SNGQPEDNY (SEQ ID NO: 13)

Bucle EF de FS18-7-33 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-33 (SEQ ID NO: 14)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
 GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGGACAACATACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTCCCTCTACAGCAAGCTACCCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
 CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAACGCTCTCCCTGTCTCCGGGT

10 Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-33 (SEQ ID NO: 15)

GQPREPVYTLPPSWDEPGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-33, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 16)

APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPGED
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPG

15 Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-33 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 17)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPGEDVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-36

Bucle AB de FS18-7-36 - WDEPGED (SEQ ID NO: 1)

Bucle CD de FS18-7-36 - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 18)

20 Bucle EF de FS18-7-36 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-36 (SEQ ID NO: 19)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
 GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCC
 TACTCCTCTACAGCAAGCTACCCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAACGCTCTCCCTGTCTCCGGG
 T

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-36 (SEQ ID NO: 20)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSYFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de CH2+CH3 de dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-36, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 21)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSYFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM

5 HEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-36 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 22)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSYFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-58

Bucle AB de FS18-7-58 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

10 Bucle CD de FS18-7-58 - SNGYPEIEF (SEQ ID NO: 23)

Bucle EF de FS18-7-58 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-58 (SEQ ID NO 24)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGTATCCAGAAATCGAATTCAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTTATGATAGGTGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-58 (SEQ ID NO: 25)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTPPVLDSDGSFFLY
15 SKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-58, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 26)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE
EALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-58 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 27)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
20 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-62

Bucle AB de FS18-7-62 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

Bucle CD de FS18-7-62 - SNGIPEWNY (SEQ ID NO: 28)

25 Bucle EF de FS18-7-62 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-62 (SEQ ID NO: 29)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGATCCCAGAACTGGAACTATAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-62 (SEQ ID NO: 30)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-62, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 31)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-62 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 32)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

10 Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-65

Bucle AB de FS18-7-65 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

Bucle CD de FS18-7-65 - SNGYAEYN (SEQ ID NO: 33)

Bucle EF de FS18-7-65 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-65 (SEQ ID NO: 34)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGTATGCAGAAATAACTATAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG

15 CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-65 (SEQ ID NO: 35)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-65, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 36)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

20

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-65 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 37)

APELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-78

Bucle AB de FS18-7-78 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

5 Bucle CD de FS18-7-78 - SNGYKEENY (SEQ ID NO: 38)

Bucle EF de FS18-7-78 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-78 (SEQ ID NO 39)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGTGAA
 GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
 AGCAATGGGTATAAAGAAGAAAATATAAGACCACGCCCTCCCGTGCCTGGACTCCGACGGCTCCT
 TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTGATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
 CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-78 (SEQ ID NO: 40)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTPPVLDSDGSFFL
 10 YSKLTVPYDRWWWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-78, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 41)

APEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
 VS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab CH3 FS18-7-78 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 42)

APELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCVMHE
 15 ALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-88

Bucle AB de FS18-7-88 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

Bucle CD de FS18-7-88 - SNGVPELNV (SEQ ID NO: 43)

Bucle EF de FS18-7-88 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

20 Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-88 (SEQ ID NO 44)

GGCCAGCCTCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGTGAA
 GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
 AGCAATGGGTCCAGAACTGAACGTTAACGACCACGCCCTCCCGTGCCTGGACTCCGACGGCTCCT
 TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTGATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
 CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-88 (SEQ ID NO: 45)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGVEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-88, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 46)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMH

5 EALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-88 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 47)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

Secuencias de aminoácidos de las regiones de bucle de Fcab FS18-7-95

Bucle AB de FS18-7-95 - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

10 Bucle CD de FS18-7-95 - SNGYQEDNY (SEQ ID NO: 48)

Bucle EF de FS18-7-95 - PYDRWWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-95 (SEQ ID NO 49)

GGCCAGCCTCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGTATCAGGAAGATAACTATAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTACCCTGCCGTATGATAGGTGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACACAGAAGAGCCTCCCTGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de Fcab FS18-7-95 (SEQ ID NO: 50)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGVEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTPPVLDSDGSFFL
15 YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-95, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 51)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab FS18-7-95 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 52)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE

20 ALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 53)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG1 humana que comprende la “mutación LALA” (subrayada) (SEQ ID NO: 54)

**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK**

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab de “tipo silvestre” sin mutación LALA (SEQ ID NO: 55).

**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA**

5 **LHNHYTQKSLSLSPG**

Secuencia de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de Fcab de “tipo silvestre”, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 56)

**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
EALHNHYTQKSLSLSPG**

Secuencia de aminoácidos de la región bisagra de IgG1 humana (SEQ ID NO: 57)

10 **EPKSCDKTHTCPPCP**

Secuencia de aminoácidos de la región bisagra truncada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 58)

TCP CPPC

Secuencia de aminoácidos del Fcab anti-LAG-3 de ratón FS18-7-108-29, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO 59)

15 *El dominio CH3 se muestra en cursiva. Los bucles AB, CD y EF del dominio CH3 se muestran en negrita y subrayados*
**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDI**VVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFS**
. CSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG**

Secuencia de aminoácidos del Fcab anti-LAG-3 de ratón FS18-7-108-29 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 60)

El dominio CH3 se muestra en cursiva. Los bucles AB, CD y EF del dominio CH3 se muestran en negrita y subrayados
**TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDI**VVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFS**
. CSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG**

20 Secuencia de aminoácidos del Fcab anti-LAG-3 de ratón FS18-7-108-35, que comprende la mutación LALA (subrayada) (SEQ ID NO: 61)

El dominio CH3 se muestra en cursiva. Las regiones de bucle AB, CD y EF se muestran en negrita y subrayadas.

**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDI**VVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFS**
CSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG**

Secuencia de aminoácidos del Fcab anti-LAG-3 de ratón FS18-7-108-35 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 62)

El dominio CH3 se muestra en cursiva. Las regiones de bucle AB, CD y EF se muestran en negrita y subrayadas.

TCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP

REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEP**

WGEDVLTCVLKGFPYPSDISVEWE**SNGQPENNY**KTPPVLSDGSFLYSKLT**PFERWMWPDEF**S

CSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-9/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 63)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFT**FSDY**WMNWRQSPEKGLEWVA**QIRNKP**NYETYYSDS

VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDMG**IYYCTGSYYGMDY**WGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP

SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**AVLQSSGLYSLSSVTV**PSSSLGTQT

YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTHTCPPCPA**P**E**AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV**

DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP**REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED****VL**T**CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-9/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 64)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFT**FSDY**WMNWRQSPEKGLEWVA**QIRNKP**NYETYYSDS

VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDMG**IYYCTGSYYGMDY**WGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP

SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**AVLQSSGLYSLSSVTV**PSSSLGTQT

YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTHTCPPCPA**P**E**AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV**

VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP**REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**

IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED****VL**T**CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-32/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 65)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFT**FSDY**WMNWRQSPEKGLEWVA**QIRNKP**NYETYYSDS

VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDMG**IYYCTGSYYGMDY**WGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP

SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**AVLQSSGLYSLSSVTV**PSSSLGTQT

YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTHTCPPCPA**P**E**AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV**

DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP**REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED****VL**T**CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-32/sin mutación LALA (SEQ ID NO: 66)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPE**A**LLGGPSVFLFPPPKD**T**LMSRTPEV**C**VVD
 VS**H**EDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NAK**T**KP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**H**Q**D**W**LNG**K**E**Y**K**C**K**V**SN**K**ALPAP
 IEKTISKAK**G**QPREP**Q**VYTLPPSW**D**EP**W**GED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SEIA**V**E**W**ES**N**G**Q**P**E**NNY**K**TP**P**V**L**

- 5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-33/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 67)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPE**A**GGPSVFLFPPPKD**T**LMSRTPEV**C**VVD
 DV**H**EDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NAK**T**KP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**H**Q**D**W**LNG**K**E**Y**K**C**K**V**SN**K**ALPAP
 API**E**KTISKAK**G**QPREP**Q**VYTLPPSW**D**EP**W**GED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIA**V**E**W**ES**N**G**Q**P**E**D**N**Y**K**TP**P**V**L**

10

- Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-33/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 68)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPE**A**GGPSVFLFPPPKD**T**LMSRTPEV**C**VVD
 VS**H**EDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NAK**T**KP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**H**Q**D**W**LNG**K**E**Y**K**C**K**V**SN**K**ALPAP
 IEKTISKAK**G**QPREP**Q**VYTLPPSW**D**EP**W**GED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIA**V**E**W**ES**N**G**Q**P**E**D**N**Y**K**TP**P**V**L**

15

- Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-33/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 69)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPE**A**GGPSVFLFPPPKD**T**LMSRTPEV**C**VVD
 DV**H**EDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NAK**T**KP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**H**Q**D**W**LNG**K**E**Y**K**C**K**V**SN**K**ALPAP
 API**E**KTISKAK**G**QPREP**Q**VYTLPPSW**D**EP**W**GED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIA**V**E**W**ES**N**G**Q**P**E**NNY**K**TP**P**V**L**

20

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-36/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 70)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VAS**G**FT**F**SDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQ**I**RNK**P**NY**E**YYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMG**I**YY**C**TGSYY**G**MD**D**YWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTV**P**SSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKV**D**KK**V**EP**K**SCDK**T**HT**C**PPCP**A**PE**L**GGPSV**F**LP**P**PK**D**TL**M**ISRT**P**E**V**CV**V**D
 VSH**E**DPEV**K**FNWY**V**D**G**VEV**H**NA**K**T**K**P**R**EE**Q**Y**N**STY**R**V**V**SL**T**VL**H**Q**D**W**L**NG**K**E**Y**
 IE**K**T**I**S**A**K**G**Q**P**RE**P**Q**V**Y**T**L**P**PS**W**DE**P**WG**E**D**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SD**I**AV**E**WE**S**NG**Q**P**E**NNY**K**TP**P**V**L**
 DSDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**R**W**V**W**P**D**E**F**SC**S**VM**H**EA**L**HN**H**YT**Q**KS**L**SLSPG

- 5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-58/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 71)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VAS**G**FT**F**SDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQ**I**RNK**P**NY**E**YYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMG**I**YY**C**TGSYY**G**MD**D**YWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTV**P**SSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKV**D**KK**V**EP**K**SCDK**T**HT**C**PPCP**A**PE**A**GGPSV**F**LP**P**PK**D**TL**M**ISRT**P**E**V**CV**V**D
 VSH**E**DPEV**K**FNWY**V**D**G**VEV**H**NA**K**T**K**P**R**EE**Q**Y**N**STY**R**V**V**SL**T**VL**H**Q**D**W**L**NG**K**E**Y**
 IE**K**T**I**S**A**K**G**Q**P**RE**P**Q**V**Y**T**L**P**PS**W**DE**P**WG**E**D**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SD**I**AV**E**WE**S**NG**Y**P**E**IE**F**K**T**PP**V**L
 LDSDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**R**W**V**W**P**D**E**F**SC**S**VM**H**EA**L**HN**H**YT**Q**KS**L**SLSPG

- 10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-58/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 72)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VAS**G**FT**F**SDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQ**I**RNK**P**NY**E**YYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMG**I**YY**C**TGSYY**G**MD**D**YWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTV**P**SSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKV**D**KK**V**EP**K**SCDK**T**HT**C**PPCP**A**PE**A**GGPSV**F**LP**P**PK**D**TL**M**ISRT**P**E**V**CV**V**D
 VSH**E**DPEV**K**FNWY**V**D**G**VEV**H**NA**K**T**K**P**R**EE**Q**Y**N**STY**R**V**V**SL**T**VL**H**Q**D**W**L**NG**K**E**Y**
 IE**K**T**I**S**A**K**G**Q**P**RE**P**Q**V**Y**T**L**P**PS**W**DE**P**WG**E**D**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SD**I**AV**E**WE**S**NG**Y**P**E**IE**F**K**T**PP**V**L
 SDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**R**W**V**W**P**D**E**F**SC**S**VM**H**EA**L**HN**H**YT**Q**KS**L**SLSPG

- 15 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-62/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 73)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VAS**G**FT**F**SDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQ**I**RNK**P**NY**E**YYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMG**I**YY**C**TGSYY**G**MD**D**YWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTV**P**SSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKV**D**KK**V**EP**K**SCDK**T**HT**C**PPCP**A**PE**A**GGPSV**F**LP**P**PK**D**TL**M**ISRT**P**E**V**CV**V**D
 VSH**E**DPEV**K**FNWY**V**D**G**VEV**H**NA**K**T**K**P**R**EE**Q**Y**N**STY**R**V**V**SL**T**VL**H**Q**D**W**L**NG**K**E**Y**
 IE**K**T**I**S**A**K**G**Q**P**RE**P**Q**V**Y**T**L**P**PS**W**DE**P**WG**E**D**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SD**I**AV**E**WE**S**NG**I**P**E**W**N**Y**K**TP**P**V**L**
 VLDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**R**W**V**W**P**D**E**F**SC**S**VM**H**EA**L**HN**H**YT**Q**KS**L**SLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-62/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 74)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASG**F**TSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**SWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTH**T**CP**C**PAPE**A**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**T**CVVD
 VSHEDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NA**K**TP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**HQDWLNG**K**CKV**S**NK**A**P
 IEKTISKAKG**Q**PREP**Q**V**T**LPPS**W**DE**P**WG**E**DVSL**T**CLV**K**G**F**YPSDIA**V**E**W**E**S**NG**I**PE**W**NY**K**TP**P**V
 DSDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**RW**W**WP**D**E**F**SCS**V**M**HE**AL**H**N**Y**T**Q**K**S**LS**L**SPG

- 5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-65/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 75)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASG**F**TSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**SWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTH**T**CP**C**PAPE**A**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**T**CVVV
 DVS**H**EDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NA**K**TP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**HQDWLNG**K**CKV**S**NK**A**P
 API**E**KTISKAKG**Q**PREP**Q**V**T**LPPS**W**DE**P**WG**E**DVSL**T**CLV**K**G**F**YPSDIA**V**E**W**E**S**NG**Y**AE**Y**NY**K**TP**P**V
 VLDSDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**RW**W**WP**D**E**F**SCS**V**M**HE**AL**H**N**Y**T**Q**K**S**LS**L**SPG

- 10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-65/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 76)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASG**F**TSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**SWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTH**T**CP**C**PAPE**A**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**T**CVVD
 VSHEDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NA**K**TP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**HQDWLNG**K**CKV**S**NK**A**P
 IEKTISKAKG**Q**PREP**Q**V**T**LPPS**W**DE**P**WG**E**DVSL**T**CLV**K**G**F**YPSDIA**V**E**W**E**S**NG**Y**AE**Y**NY**K**TP**P**V
 DSDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**RW**W**WP**D**E**F**SCS**V**M**HE**AL**H**N**Y**T**Q**K**S**LS**L**SPG

- 15 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-78/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 77)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**TGGGLVQPGRPMKLS**C**VASG**F**TSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFT**I**SRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**SWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**VEPKSCDKTH**T**CP**C**PAPE**A**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**T**CVVV
 DVS**H**EDPEV**K**FNWYDGVEV**H**NA**K**TP**R**EEQ**Y**NSTYRV**V**SLTV**L**HQDWLNG**K**CKV**S**NK**A**P
 API**E**KTISKAKG**Q**PREP**Q**V**T**LPPS**W**DE**P**WG**E**DVSL**T**CLV**K**G**F**YPSDIA**V**E**W**E**S**NG**Y**KE**E**NY**K**TP**P**V
 VLDSDGSFFLYSKLT**V****P**Y**D**RW**W**WP**D**E**F**SCS**V**M**HE**AL**H**N**Y**T**Q**K**S**LS**L**SPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-78/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 78)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWAQ**I**RNK**P**NYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDM**G**IYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVN**H**KPSNT**K**DK**V**EPK**S**CD**K**T**H**TC**P**PCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VSHEDPEV**K**FNWYV**D**G**V**EV**H**NA**K**T**K**P**R**EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 IEKTISKAKG**Q**PREP**Q**YTL**P**PSWDEPW**G**ED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIAVEWE**SNGYKEENY**K**T**PP**V**
 DSDGSFFLYSKLT**V**PYDRW**V**WP**D**E**F**SCS**V**M**HEALHN**HT**Q**KS**L**SP**G**

- 5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-88/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 79)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWAQ**I**RNK**P**NYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDM**G**IYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVN**H**KPSNT**K**DK**V**EPK**S**CD**K**T**H**TC**P**PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEV**K**FNWYV**D**G**V**EV**H**NA**K**T**K**P**R**EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 API**E**KTISKAKG**Q**PREP**Q**YTL**P**PSWDEPW**G**ED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIAVEWE**SNGVPELN**V**K**TP**P**
 VLDSDGSFFLYSKLT**V**PYDRW**V**WP**D**E**F**SCS**V**M**HEALHN**HT**Q**KS**L**SP**G**

- 10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-88/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 80)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWAQ**I**RNK**P**NYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDM**G**IYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVN**H**KPSNT**K**DK**V**EPK**S**CD**K**T**H**TC**P**PCPAPEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEV**K**FNWYV**D**G**V**EV**H**NA**K**T**K**P**R**EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 IEKTISKAKG**Q**PREP**Q**YTL**P**PSWDEPW**G**ED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIAVEWE**SNGVPELN**V**K**TP**P**
 DSDGSFFLYSKLT**V**PYDRW**V**WP**D**E**F**SCS**V**M**HEALHN**HT**Q**KS**L**SP**G**

- 15 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-95/4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 81)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMKLS**C**VASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWAQ**I**RNK**P**NYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLQMNNLRVEDM**G**IYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYF**P**EPV**T**WSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVN**H**KPSNT**K**DK**V**EPK**S**CD**K**T**H**TC**P**PCPAPEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEV**K**FNWYV**D**G**V**EV**H**NA**K**T**K**P**R**EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 API**E**KTISKAKG**Q**PREP**Q**YTL**P**PSWDEPW**G**ED**V**SL**T**CL**V**K**G**F**P**SDIAVEWE**SNGYQEDNY**K**T**PP**V**
 VLDSDGSFFLYSKLT**V**PYDRW**V**WP**D**E**F**SCS**V**M**HEALHN**HT**Q**KS**L**SP**G**

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 humana/FITC FS18-7-95/4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 82)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNK**P**YNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDM**G**IYCTGYMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAA**L**GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**KVEPK**C**DKTH**T**CPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**C**VVD
 VS**H**EDPEVKFNWYVG**E**VHNA**K**TPREEQYNSTYRV**V**SLTVLHQDWLNGKEYKCKV**S**NKALPAP
 IEKTISK**A**KG**Q**PREPQVYTLPPSWDEP**W**G**E**DVS**L**TCLV**K**G**F**YPSDIA**V**EWESNY**Q**ED**N**Y**K**TP**P**V**L**
 DSDGSFFLYSKLTVY**D**R**W**W**P**D**E**F**S**CSVM**H**EA**L**H**N**HY**T**Q**K**SL**S**LS**P**G

- 5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb anti-FITC 4420 que comprende la mutación LALA (SEQ ID NO: 83)

La posición de las CDR está subrayada. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNK**P**YNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDM**G**IYCTGYMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAA**L**GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**KVEPK**C**DKTH**T**CPCPAPEAGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**C**VVV
 DV**H**EDPEVKFNWYVG**E**VHNA**K**TPREEQYNSTYRV**V**SLTVLHQDWLNGKEYKCKV**S**NKALP
 API**E**KTISK**A**KG**Q**PREPQVYTLPPSR**E**LT**K**N**Q**VS**L**TCLV**K**G**F**YPSDIA**V**EWE**S**NG**Q**PEN**N**Y**K**TP**P**V**L**
 LDSDGSFFLYSKLTVD**K**SRW**Q**QGNVF**S**CSVM**H**EA**L**H**N**HY**T**Q**K**SL**S**LS**P**G

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb anti-FITC 4420 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 84)

- 10 *La posición de las CDR está subrayada.*

EVKLD**E**GGGLVQPGRPMK**L**SCVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNK**P**YNYETYYSDS
 VKGRFTISR**D**DSKSSVYLMQNNLRVEDM**G**IYCTGYMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAA**L**GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP**A**VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHP**S**NTKVD**K**KVEPK**C**DKTH**T**CPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV**C**VVD
 VS**H**EDPEVKFNWYVG**E**VHNA**K**TPREEQYNSTYRV**V**SLTVLHQDWLNGKEYKCKV**S**NKALP
 IEKTISK**A**KG**Q**PREPQVYTLPPSR**E**LT**K**N**Q**VS**L**TCLV**K**G**F**YPSDIA**V**EWE**S**NG**Q**PEN**N**Y**K**TP**P**V**L**
 SDGSFFLYSKLTVD**K**SRW**Q**QGNVF**S**CSVM**H**EA**L**H**N**HY**T**Q**K**SL**S**LS**P**G

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb anti-FITC 4420 (SEQ ID NO: 85)

La posición de las CDR está subrayada.

DV**V**MT**Q**TPLSLPVSLGD**Q**ASISCRSSQSLV**H**SGNT**Y**LRW**Y**LQ**K**PG**Q**SP**K**VL**I**Y**K**V**S**NR**F**SG**V**PD**R**
 SG**G**SG**G**T**D**FT**L**K**I**R**V**E**A**DL**G**V**Y**F**C**S**Q**ST**H**W**P**WT**F**GG**G**T**K**LE**I**K**R**T**V**A**P**S**V**I**F**PP**S**D**E**QL**K**SG**T**
 S**V**V**C**LL**N**N**F**Y**P**REAK**V**Q**W**K**V**D**N**AL**Q**SG**N**S**Q**E**S**V**T**E**Q**DS**K**D**S**T**Y**SL**S**ST**L**SK**A**D**Y**E**K**H**K**V**Y**ACE**V**
 TH**Q**GL**S**SP**V**T**K**SF**N**R**G****E**C

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb2 anti-LAG-3 de ratón/PD-L1 FS18-7-108-29/S1 con la mutación LALA (SEQ ID NO: 86)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWWAWISPYGGSTYYADSVK
 GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQQGTLVTVASAASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLCLVKGFYPSDIVVEWESNGQPENNYKTTPP
 5 VLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb2 anti-LAG-3 de ratón/PD-L1 FS18-7-108-29/S1 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 87)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWWAWISPYGGSTYYADSVK
 GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQQGTLVTVASAASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLCLVKGFYPSDIVVEWESNGQPENNYKTTPV
 DSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLLSLSPG

10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 de ratón/PD-L1 FS18-7-108-35/S1 con la mutación LALA (SEQ ID NO: 88)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas. La posición de la mutación LALA está en negrita.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWWAWISPYGGSTYYADSVK
 GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQQGTLVTVASAASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLLSLSPG

15 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² anti-LAG-3 de ratón/PD-L1 FS18-7-108-35/S1 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 89)

La posición de las CDR está subrayada, y las secuencias de bucle AB, CD y EF están en negrita y subrayadas.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWWAWISPYGGSTYYADSVK
 GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQQGTLVTVASAASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPV
 DSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb anti-PD-L1 de ratón S1 con mutación LALA (SEQ ID NO: 90)

La posición de las CDR está subrayada. La posición de la mutación LALA está en negrita

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
 GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQQGTLVTVAASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTSKAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 ,LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb anti-PD-L1 de ratón S1 sin mutación LALA (SEQ ID NO: 91)

5 *La posición de las CDR está subrayada.*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
 GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQQGTLVTVAASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 IEKTISKAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 SDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb anti-PD-L1 de ratón S1 (SEQ ID NO: 92)

La posición de las CDR está subrayada

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLFTPPFGQGTKVEIKRTVAAPSVFPPSDEQLKSGTAVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLS
 ,SPVTKSFNRGEC

10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb anti-LAG-3 humana 25F7 (SEQ ID NO 93)

La posición de las CDR está subrayada.

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGFSSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPSLKSR
 VTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWQQGTLTVSSASTTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 IEKTISKAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 SDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb anti-LAG-3 humana 25F7 (SEQ ID NO 94)

La posición de las CDR está subrayada.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPPARFSGSGSG
 TDFTLTISSLQEPDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFPPSDEQLKSGTAVVCLL
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLS
 PVTTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de LAG-3 humana (SEQ ID NO 95)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVAQEGAPAQLCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQ
PDSGPPAAAPGHPLAPGPHAAPSSWGPGRPRTYTVLSVPGGLRSGRPLQPRVQLDERGRQRGD
FSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLIRIQLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRP
ASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGE
PPTPLTVYAGAGSRVGLCRLPAGVGTRSLAKWTPPGGPDLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAG
TYTCIHLQEQQQLNATVTLAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLTSPRSFSGPW
LEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLL
TGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEQL

Secuencia de aminoácidos de LAG-3 de ratón (SEQ ID NO 96)

MREDLLGFLLLGLLWEAPVVSAGPGKELPVVVAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNFLRRGGVIWQHQ
PDSGQPTPIPALDLHQGMPSPRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQLPHVQLEERGLQRGDFSLWL
RPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPGVULKSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHW
FQGQNRPVYNNSPRHFLAETFLLPQVSPLDGWTGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTVYA
AEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGPelpVAGKSGNFTLHLEAVGLAQAQGTYTCIHLQG
QQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASGKERFVWRPLNNLSRSCPGPVLEIQEARLLAE
RWQCQLYEGQRLLGATVYAAESSSGAHSARRISGDLKGGHLVLLGALSLFLLVAGAFGFHWWRK
QLLRRFSALEHGIQPFFAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPEPEPEPEQL

5 Secuencia de aminoácidos LAG-3 de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 97)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVAQEGAPAQLCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQ
PDSGPPAAAPGHPPVPGHRPAAPYSWGPGRPRTYTVLSVPGGLRSGRPLQPRVQLDERGRQRG
DFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRLVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDR
PASVHWFRSRGQGRVPVQGSPHHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGL
EPATPLTVYAGAGSRVELCRLPPAVGTQSFLAKWAPPGGCPDLVAGDNGDFTLRLEDVSQAQA
GTYICHIRLQQQLNATVTLAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPASGQEHFVWSPNTPSQRSPGP
WLEAQEAQLLSQPWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHPLFLILGVLFLL
LVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPELERELGPEPEPGPEPEP
EQL

Bibliografía

Bae J, Lee SJ, Park CG, Lee YS, Chun T. Trafficking of LAG-3 to the surface on activated T cells via its cytoplasmic domain and protein kinase C signaling. *J Immunol.* 193(6),3101-12 (2014).

Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 176(8),4622-31 (2006).

Bedzyk WD, Johnson LS, Riordan GS, Voss EW Jr. Comparison of Variable Region Primary Structures within an Anti-Fluorescein Idiotype Family. *Biol. Chem.* 264, 1565-1569 (1989).

Bedzyk WD, Herron JN, Edmundson AB, Voss EW Jr. Active site structure and antigen binding properties of idiotypically cross-reactive anti-fluorescein monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* 265(1),133-8 (1990).

Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113, 3716-25, (2009).

Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De Filippo A, Triebel F, Parmiani G, Belli F, Rivoltini L, Castelli C. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol.* 184(11),6545-51 (2010).

Demeure, C. E., Wolfers, J., Martin-Garcia, N., Gaulard, P. & Triebel, F. T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell-cell contacts. *European Journal of Cancer* 37, 1709-1718 (2001).

Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, Drake CG. Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T cells to be suppressed in vivo. *PLoS One.* 9(11), e109080 (2015).

Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, Elliott S, Gill D, Marlton P, Seymour J, Khanna R. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8 $+$ T cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 108(7),2280-9 (2006).

Huard B, Mastrangeli R, Prigent P,et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94,5744-9 (1997).

Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 180(9),5916-26 (2008).

Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood.* 113(16),3821-3 (2009).

Sega EI, Leveson-Gower DB, Florek M, Schneidawind D, Luong RH, Negrin RS. Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation. *PLoS One.* 9(1), e86551 (2014).

Sudo T, Nishikawa S, Ogawa M, Kataoka H, Ohno N, Izawa A, Hayashi S, Nishikawa S. Functional hierarchy of c-kit and c-fms in intramarrow production of CFU-M. *Oncogene.* 11(12),2469-76 (1995).

Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 12(6),492-9 (2011).

Wolchok J et al; Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 369(2),122-33 (2013)

Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tangsombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG, Vignali DA. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 72(4),917-2 (2012).

Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol.* 174(2),688-95 (2005).

Workman CJ, Vignali DA. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *Eur J Immunol.* 33(4),970-9 (2003).

Xu D, Alegre ML, Varga SS, Rothermel AL, Collins AM, Pulito VL, Hanna LS, Dolan KP, Parren PW, Bluestone JA, Jolliffe LK, Zivin RA. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell. Immunol.* 200, 16–26 (2000)

Yamashita Y, Hooker SW, Jiang H, Laurent AB, Resta R, Khare K, Coe A, Kincade PW, Thompson LF. CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol.* 28(10),2981-90 (1998).

REIVINDICACIONES

5 1. Una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un sitio de unión a antígeno LAG-3 ubicado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el sitio de unión a antígeno LAG-3 comprende las secuencias de aminoácidos WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) y PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3), y en donde la secuencia de aminoácidos WDEPWGED está ubicada en el bucle AB del dominio CH3 y la secuencia de aminoácidos PYDRWVWPDE está ubicada en el bucle EF del dominio CH3.

10 2. La molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en donde el sitio de unión a antígeno LAG-3 comprende además una de las siguientes secuencias en el bucle CD del dominio CH3:

- (i) SNGQPENNY (SEQ ID NO: 2);
- (ii) SNGQPEDNY (SEQ ID NO: 13);
- (iii) SNGYPEIEF (SEQ ID NO: 23);
- (iv) SNGIPEWNY (SEQ ID NO: 28);
- (v) SNGYAEYNY (SEQ ID NO: 33);
- (vi) SNGYKEENY (SEQ ID NO: 38);
- 15 (vii) SNGVPELNV (SEQ ID NO: 43); o
- (viii) SNGYQEDNY (SEQ ID NO: 48);

preferiblemente SEQ ID NO: 2, 28 o 38, preferiblemente SEQ ID NO: 2.

20 3. La molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en donde:

- (i) el dominio CH3 es un dominio CH3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, preferiblemente un dominio CH3 de IgG1 humana; y/o
- (ii) la molécula de anticuerpo o fragmento del mismo comprende el dominio CH3 expuesto en SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferiblemente SEQ ID NO: 5, 30 o 40, preferiblemente SEQ ID NO: 5.

25 4. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dominio CH2 de la molécula de anticuerpo es el dominio CH2 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, preferiblemente IgG1 humana, en donde, opcionalmente, el dominio CH2 tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

5. El fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el fragmento de anticuerpo comprende además un dominio CH2, opcionalmente en donde el fragmento de anticuerpo comprende el dominio CH2 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, preferiblemente IgG1 humana, opcionalmente en donde el dominio CH2 tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

30 6. La molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la molécula de anticuerpo o fragmento del mismo comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 41, 42, 46, 47, 51 o 52, preferiblemente SEQ ID NO: 6, 7, 31, 32, 41 o 42, preferiblemente SEQ ID NO: 6 o 7.

35 7. La molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende una región bisagra de inmunoglobulina, o parte de la misma, en el extremo N-terminal del dominio CH2, opcionalmente en donde la región bisagra, o parte de la misma, es una región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o parte de la misma, preferiblemente una región bisagra de IgG1 humana, o parte de la misma, opcionalmente en donde la región bisagra o parte de la misma tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 58.

40 8. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 7, en donde la molécula de anticuerpo es una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, preferiblemente una molécula de IgG1 humana.

9. Una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y 6 a 8, en donde el sitio de unión a antígeno basado en CDR de la molécula de anticuerpo se une a una molécula que es un modulador del sistema inmunitario, opcionalmente en donde:

(a)

- 45 (i) el modulador del sistema inmunitario es un receptor inmunomodulador o un ligando para un receptor inmunomodulador; o
- (ii) el sitio de unión a antígeno basado en CDR es específico para una molécula que es un inhibidor o activador

del sistema inmunitario, preferiblemente un inhibidor del sistema inmunitario;

y/o

(b) el sitio de unión a antígeno basado en CDR es específico para un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), inmunoglobulina de células T y proteína 3 que contiene dominio de mucina (TIM-3), CD73 y receptor de factor 1 estimulante de colonias (CSF1R).

- 5 10. La molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de anticuerpo o fragmento del mismo está conjugada con un modulador del sistema inmunitario, una molécula citotóxica, un radioisótopo o un marcador detectable, opcionalmente en donde el modulador del sistema inmunitario o la molécula citotóxica es una citocina.
- 10 11. Un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Una célula hospedadora recombinante que comprende el ácido nucleico o vector de la reivindicación 11.
- 15 13. Un método para producir una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar la célula hospedadora recombinante de la reivindicación 12 en condiciones para la producción de la molécula de anticuerpo o fragmento del mismo, que comprende opcionalmente además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo o fragmento del mismo.
14. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 10, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 15. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 10, para su uso en un método para tratar el cáncer en un paciente, en donde el sitio de unión a antígeno basado en CDR de la molécula de anticuerpo se une a una molécula que es un modulador del sistema inmunitario, y opcionalmente en donde el método comprende además administrar al paciente:
- 25 (i) una vacuna antitumoral; o
- (ii) un agente quimioterápico.

Figure 1

	Identidad con FS18-7-9
Fcab	
FS18-7-32	99,1%
FS18-7-33	99,1%
FS18-7-36	99,1%
FS18-7-58	96,2%
FS18-7-62	98,1%
FS18-7-65	97,2%
FS18-7-78	97,2%
FS18-7-88	97,2%
FS18-7-95	97,2%

Figura 1, continuación

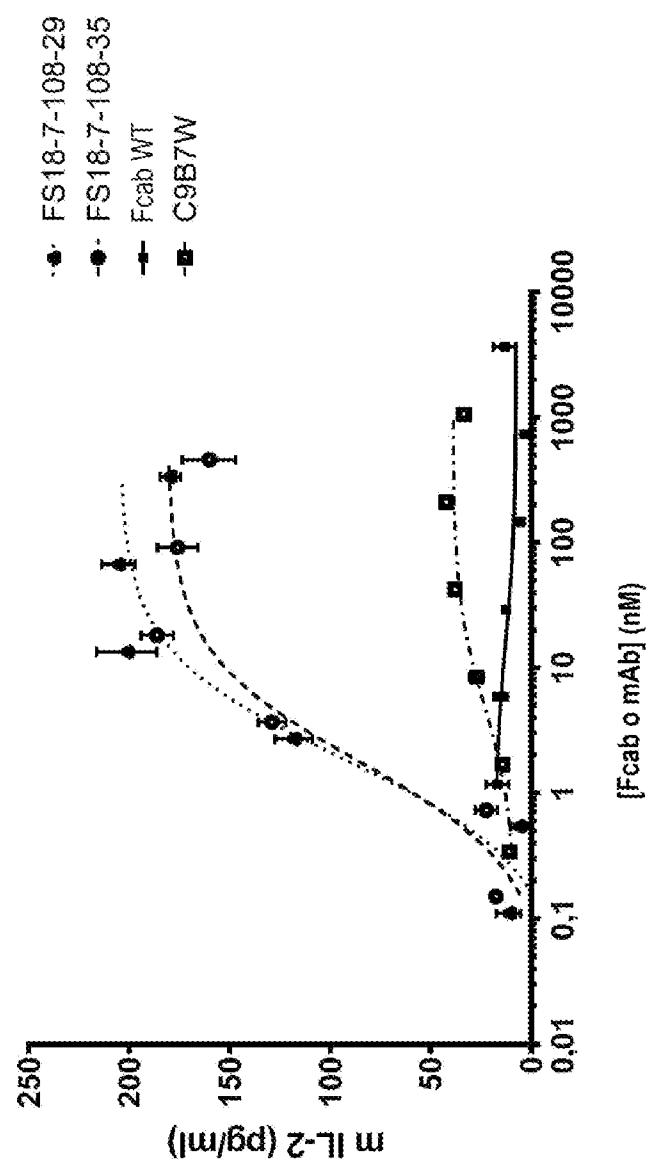
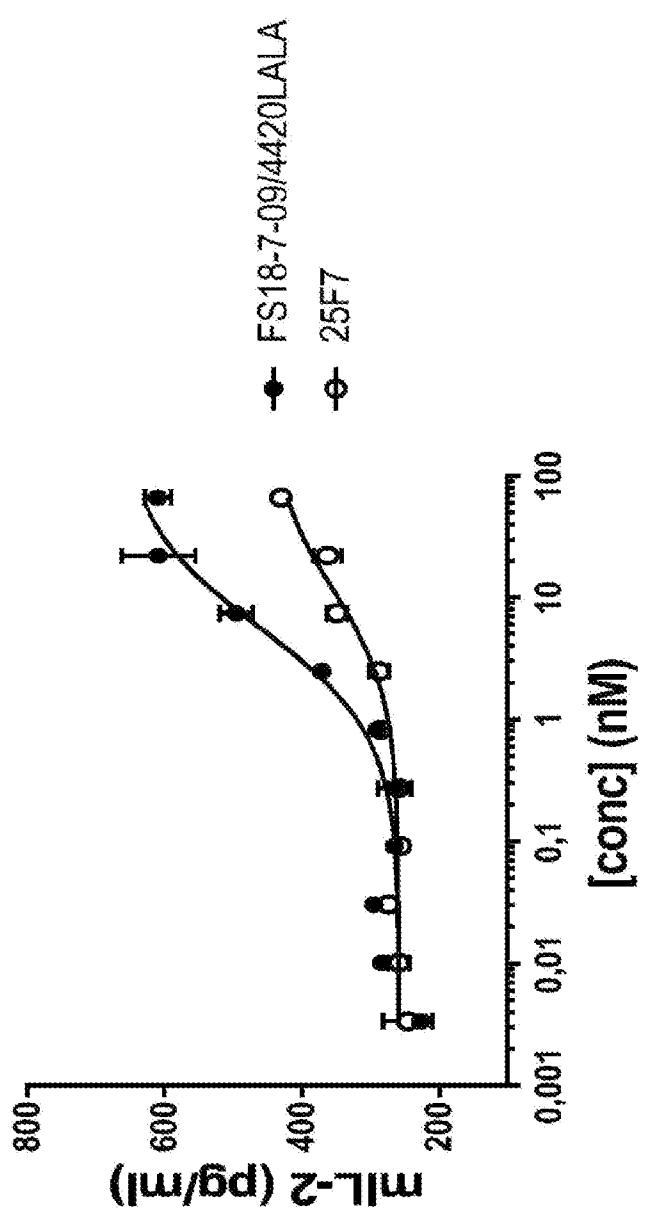


Figure 2



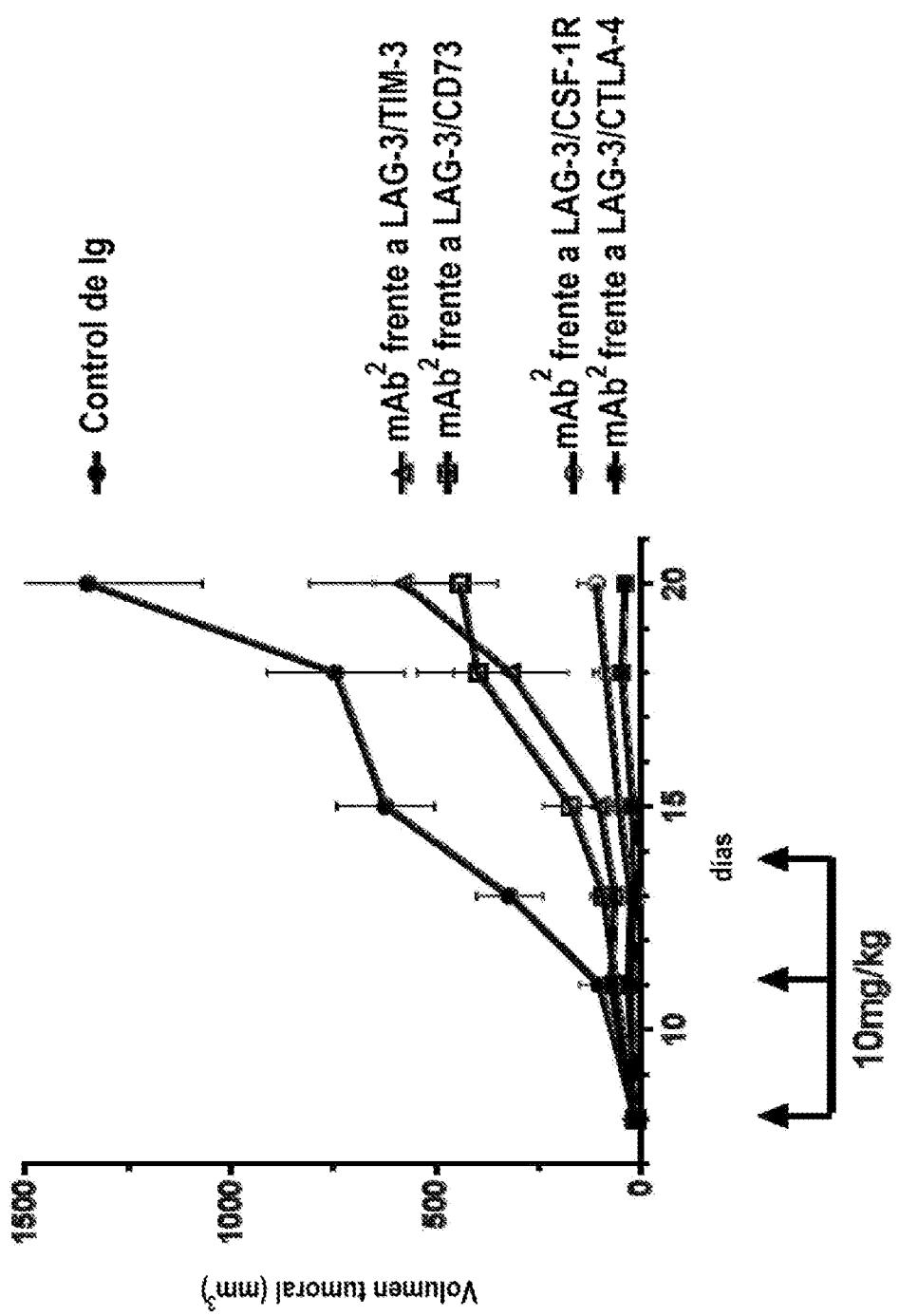
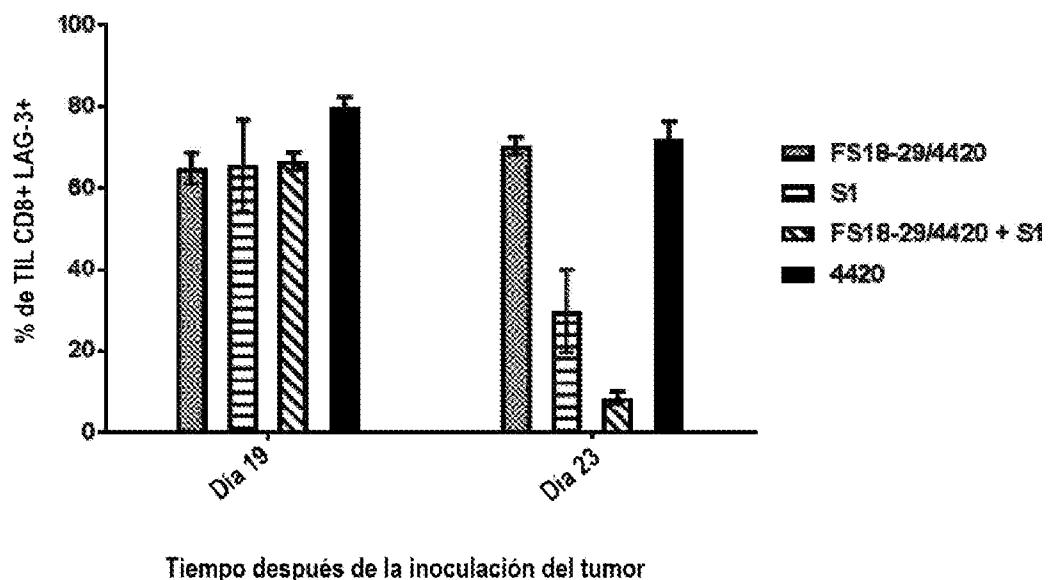


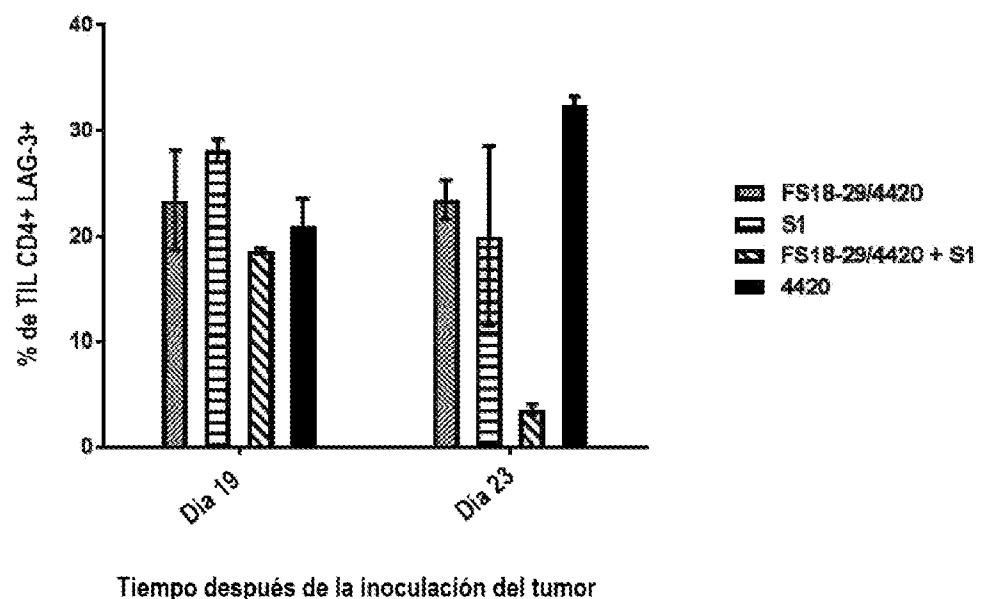
Figure 4

A



Tiempo después de la inoculación del tumor

B



Tiempo después de la inoculación del tumor

Figura 5

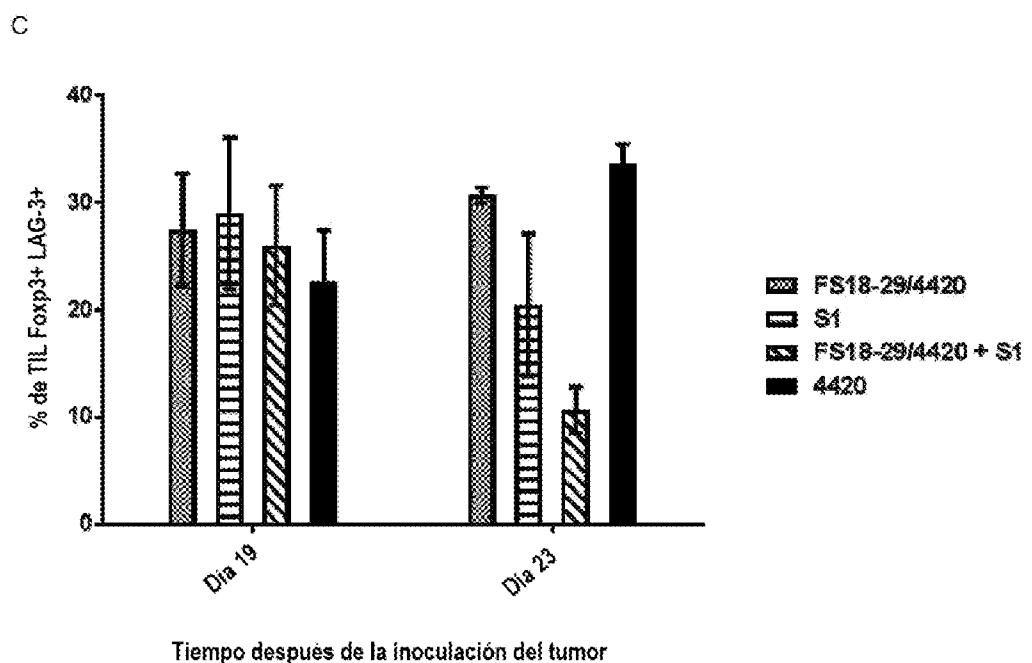


Figura 5, continuación