



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 965 352**

⑮ Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2018** PCT/US2018/035134
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018** WO18222718
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2018** E 18735009 (5)
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023** EP 3631454

⑮ Título: **Tratamiento de tumores positivos a gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3)**

⑯ Prioridad:

30.05.2017 US 201762512648 P
01.06.2017 US 201762513813 P
07.09.2017 US 201762555176 P
06.11.2017 US 201762582178 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2024

⑯ Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

⑯ Inventor/es:

NOVOTNY, JAMES JR.;
LONBERG, NILS;
HEDVAT, CYRUS;
CLYNES, RAPHAEL;
LOCKE, DARREN;
COGSWELL, JOHN P.;
JACKSON, JEFFREY;
HARBISON, CHRISTOPHER y
EDWARDS, ROBIN

⑯ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 965 352 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

Tratamiento de tumores positivos a gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3)

5 **Campo de la invención**

La invención descrita aquí se refiere a métodos para tratar un tumor maligno positivo a LAG-3 en un paciente humano con un inhibidor de la ruta de PD-1, a una combinación de un inhibidor de la ruta de PD1 y un inhibidor del punto de control inmunológico, a una combinación de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, o a un anticuerpo 10 de anti-CTLA-4.

Antecedentes de la invención

15 El gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3; CD223) es una proteína transmembrana del tipo I que se expresa sobre la superficie celular de las células T CD4+ y CD8+ activadas y los subconjuntos de células NK y dendríticas (Triebel F, *et al.*, *J. Exp. Med.* 1990; 171:1393-1405; Workman C J, *et al.*, *J. Immunol.* 2009; 182(4):1885-91). El LAG-3 está estrechamente relacionado con CD4, que es un coreceptor para la activación de células auxiliadoras T. Ambas moléculas tienen 4 dominios semejantes a Ig extracelulares y requieren la unión a su ligando, el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, por sus siglas en inglés) clase II, para su actividad funcional. Al contrario de CD4, el 20 LAG-3 solamente se expresa sobre la superficie celular de las células T activadas y su escisión de la superficie celular termina en la señalización de LAG-3. El LAG-3 también se puede encontrar como una proteína soluble, pero no se une al MHC clase II y se desconoce la función del LAG-3 soluble.

25 Se ha informado que el LAG-3 desempeña un papel importante en la promoción de la actividad de las células T reguladoras (Treg) y en la regulación negativa de la activación y proliferación de las células T (Workman C J, *et al.*, *J. Immunol.* 2005; 174:688-695). Tanto Treg naturales como inducidas expresan un aumento de LAG-3, el cual es requerido para su función supresora máxima (Camisaschi C, *et al.*, *J. Immunol.* 2010; 184:6545-6551 y Huang CT, *et al.*, *Immunity*. 2004; 21:503-513). Además, la expresión ectópica de LAG-3 sobre las células T efectoras CD4+ reduce su capacidad proliferativa y les confiere un potencial regulador contra las terceraas células T compartidas (Huang C T, *et al.*, *Immunity*. 2004; 21:503-513). Estudios recientes también han mostrado que la alta expresión de LAG-3 sobre las células T CD8+ específicas para el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) agotadas contribuye a su estado sin respuesta y limita las respuestas antitumorales de las células T CD8+ (Blackburn S D, *et al.*, *Nat. Immunol.* 2009; 10:29-37 y Grosso J F, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3383-3392). De hecho, el LAG-3 mantuvo la tolerancia a los 30 antígenos tumorales y propios a través de los efectos directos sobre las células T CD8+ en 2 modelos de murino (Grosso J F, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3383-3392).

35 Sin embargo, la tolerancia inmunológica observada en el entorno del desarrollo tumoral y la recurrencia tumoral parece que va ser mediada por la coexpresión de varios receptores reguladores negativos de las células T, no solamente del LAG-3. Los datos de los modelos de infección viral crónica (Blackburn S D, *et al.*, *Nat. Immunol.* 2009; 10:29-37, 40 Grosso J F, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3383-3392, y Lyford-Pike S, *et al.*, *Cancer Res.* 2013; 73(6):1733-41), los ratones modificados genéticamente (Woo S R, *et al.*, *Cancer Res.* 2012; 72:917-927; Okazaki T, *et al.*, *J. Exp. Med.* 2011; 208:395-407, y Bettini M, *et al.*, *J. Immunol.* 2011; 187:3493-3498), los modelos de recurrencia tumoral (Goding S R, *et al.*, *J. Immunol.* 2013; 190(9):4899-4909) y, en mayor medida, los pacientes humanos con cáncer (Goding S R, *et al.*, *J. Immunol.* 2013; 190(9):4899-4909, Matsuzaki J, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., EUA.* 2010; 107:7875-7880, y 45 Gandhi M K, *et al.*, *Blood.* 2006; 108:2280-2289) apoyan un modelo en donde las células T están continuamente expuestas para que el antígeno llegue a ser progresivamente inactivado a través de un proceso denominado "agotamiento". Las células T agotadas se caracterizan por la expresión de los receptores reguladores negativos de las células T, predominantemente el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), de la muerte celular programada 1 (PD-1), y LAG-3, cuya acción es limitar la capacidad de las células para proliferar, producir citoquinas, y matar células 50 objetivo y/o para aumentar la actividad de Treg. Sin embargo, la temporización y la secuencia de la expresión de estas moléculas en el desarrollo y recurrencia de tumores no se han caracterizado completamente.

PD-1 es un receptor de señalización de la superficie celular que desempeña un papel crítico en la regulación de la activación y tolerancia de las células T (Keir M E, *et al.*, *Annu Rev Immunol* 2008; 26:677-704). El mismo es una 55 proteína transmembrana de tipo I y, junto con BTLA, CTLA-4, ICOS y CD28, comprende la familia CD28 de receptores coestimuladores de las células T. PD-1 se expresa principalmente en las células T activadas, las células B y, las células mieloídes (Dong H, *et al.*, *Nat Med.* 1999; 5:1365-1369). El mismo también se expresa en las células asesinas naturales (NK) (Terme M, *et al.*, *Cancer Res* 2011; 71:5393-5399). La unión de PD-1 por sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, conduce a la fosforilación del residuo de tirosina en el dominio inhibidor de la tirosina del receptor inmunológico intracelular proximal, seguido por el reclutamiento de la SHP-2 de la fosfatasa, que eventualmente conduce a una regulación negativa de la activación de células T. Un papel importante de PD-1 es limitar la actividad de las células T en los tejidos periféricos en el momento de una respuesta inflamatoria a una infección, limitando así el desarrollo de la autoinmunidad (Pardoll D M., *Nat Rev Cancer* 2012; 12:252-264). La evidencia de este papel regulador negativo proviene del descubrimiento de que los ratones deficientes en PD-1 desarrollan enfermedades autoinmunológicas 60 semejantes al lupus, que incluyen la artritis y la nefritis, junto con la cardiomiopatía (Nishimura H, *et al.*, *Immunity*, 1999; 11:141-151; y Nishimura H, *et al.*, *Science*, 2001; 291:319-322). En el entorno del tumor, la consecuencia es el 65

- desarrollo de una resistencia inmunológica dentro del microambiente tumoral. PD-1 se expresa altamente en los linfocitos infiltrantes del tumor, y sus ligandos están regulados positivamente sobre la superficie celular de muchos tumores diferentes (Dong H, *et al.*, Nat Med 2002; 8:793-800). Múltiples modelos de cáncer de murino han mostrado que la unión del ligando a PD-1 conduce a la evasión inmunológica. Además, el bloqueo de esta interacción conduce a una actividad antitumoral (Topalian S L, *et al.* NEJM 2012; 366(26):2443-2454; Hamid O, *et al.*, NEJM 2013; 369:134-144). Además, se ha mostrado que la inhibición de la interacción de PD-1/PD-L1 tiene un papel mediador en la potente actividad antitumoral en los modelos preclínicos (patentes U.S. números 8.008.449 y 7.943.743).
- 5 Llosa N. J., *et al.* Cancer Discov. 2015;5(1):43-51 analiza la expresión regulada positivamente de múltiples puntos de control inmunológicos, incluyendo PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 e IDO, en tumores de colon inestables de microsatélites. Xiao Y, *et al.* Cancer Discov. 2015;5(1):16-8 analizan el subconjunto inestable de microsatélites de cáncer colorrectal como un candidato para la inmunoterapia de bloqueo de punto de control. Sweis R. F. *et al.* Cancer Immunol Res. 2016;4(7):563-8 analizan la regulación positiva de genes que codifican las proteínas de punto de control inmunológico PD-L1, IDO, FOXP3, TIM3 y LAG3 estando asociadas a tumores de vejiga urotelial invasivos de músculo inflamado con células T.
- 10 Recientemente, varios inhibidores de la ruta del punto de control inmunológico han comenzado a proporcionar nuevos métodos inmunoterapéuticos para tratar el cáncer, incluyendo el desarrollo de un anticuerpo (Ab), ipilimumab (YERVOY®), que se une a, e inhibe el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado, el desarrollo de anticuerpos tales como nivolumab y pembrolizumab (anteriormente lambrolizumab; declaración del consejo de USAN, Pembrolizumab (2013): declaración de un nombre no patentado adoptado por el consejo de USAN (ZZ-165), 27 de noviembre del 2013) que se unen específicamente al receptor de muerte programada 1 (PD-1) y bloquean la ruta inhibidora del ligando de PD-1/PD-1, y el desarrollo de un anticuerpo, BMS-986016 (como se describe en la patente U.S. 9.505.839) que se une específicamente a LAG-3 y es capaz de estimular respuestas inmunológicas. Ascierto P. A., *et al.* Journal of Clinical Oncology, vol. 35, n.º 15 supl, 2017, páginas 9520-9520 analiza la efectividad inicial de BMS-986016 en combinación con nivolumab en pacientes con melanoma tratado previamente con terapia anti-PD-1/PD-L1. El documento WO 2015/042246 A1 analiza una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anticuerpos anti-PD-1 para tratar tumores.
- 15 20 25 30 35 40 45
- La promesa del campo emergente de la medicina personalizada es que los avances en la farmacogenómica se usarán cada vez más para adaptar las técnicas terapéuticas a las subpoblaciones definidas y, en última instancia, a pacientes individuales para mejorar la eficacia y reducir los efectos adversos. Los éxitos recientes incluyen, por ejemplo, el desarrollo de mesilato de imatinib (GLEEVEC®), un inhibidor de tirosina cinasa de la proteína que inhibe la tirosina cinasa bcr-abl, para tratar la leucemia mielógena crónica (CML) positiva al cromosoma de Filadelfia; crizotinib (XALKORI®) para tratar al 5 % de los pacientes con cánceres de pulmón de células no pequeñas en etapa tardía que expresan un gen de la cinasa del linfoma anaplásico (ALK) mutante; y vemurafenib (ZELBORAF®), un inhibidor de la proteína B-RAF mutada (V600E-BRAF) que se expresa alrededor de la mitad de los tumores de melanoma. Sin embargo, a diferencia del desarrollo clínico de agentes de moléculas pequeñas que tienen como objetivo las mutaciones de activación discretas que se encuentran en las poblaciones con cáncer seleccionadas, un desafío particular en la inmunoterapia contra el cáncer ha sido la identificación de biomarcadores predictivos para permitir la selección de pacientes y el manejo del tratamiento guía. De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos mejorados para tratar tumores.
- Breve descripción de la invención**
- 45 La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- 50 Se desvela pero no se reivindica aquí un método para seleccionar un tumor maligno en un paciente humano para el tratamiento con una combinación de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. El método comprende detectar la expresión de LAG-3 en el tumor. El método puede comprender detectar la expresión de LAG-3 y la expresión de PD-L1 en el tumor. También se describen aquí un inhibidor o un anticuerpo para su uso en métodos para tratar tumores positivos a LAG-3 en un paciente humano que comprenden administrar un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1.
- 55 60 65
- Se desvela pero no se reivindica aquí un método para seleccionar un tumor maligno en un paciente humano para inmunoterapia, que comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y seleccionar el tumor para inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Un método para identificar un tumor maligno en un paciente humano como elegible para la inmunoterapia, comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; e identificar el tumor como elegible para la inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Un método para identificar un tumor maligno en un paciente humano que probablemente responda a una inmunoterapia comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; e identificar el tumor que probablemente responda al tratamiento si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Un método para clasificar un tumor maligno en un paciente humano que probablemente responda a una inmunoterapia comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y clasificar el tumor que probablemente responda a la inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra del tumor. En algunas modalidades, la inmunoterapia

comprende poner en contacto el tumor con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende poner en contacto el tumor con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1.

5 Un método para identificar un paciente con un tumor maligno que probablemente responda a una inmunoterapia comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; e identificar al paciente que probablemente responda al tratamiento si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Un método para seleccionar un 10 paciente con un tumor maligno para la inmunoterapia comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y seleccionar al paciente para la inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra del tumor. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1.

15 10 La invención descrita aquí se refiere a un inhibidor o un anticuerpo para su uso en un método para tratar un tumor maligno en un paciente humano, comprendiendo el método: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo anti-LAG-3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y en donde el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo 20 anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo anti-PD-L2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; en donde se predice que el paciente responderá al tratamiento con el inhibidor de LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 basado en la expresión de LAG-3 en una muestra del tumor del paciente, en donde se predice que el paciente responderá al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positivo a LAG-3 y en donde la muestra es positiva a LAG-3 25 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.

30 En algunas modalidades, el inhibidor o el anticuerpo para su uso como se detalla anteriormente comprende: determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1 si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra del tumor.

35 En algunas modalidades, comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde el paciente se identifica teniendo un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración.

40 En algunas modalidades, comprende: identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3; y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3.

45 40 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para extender un período de supervivencia libre de progresión durante más de 12 meses en un paciente humano afectado por un tumor maligno que comprende administrar al paciente un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde el paciente demuestra una supervivencia libre de progresión durante más de 12 meses. En algunas modalidades, se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En 50 algunas modalidades, se identifica al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, la supervivencia libre de progresión del paciente se extiende después de la administración durante más de aproximadamente 13 meses, aproximadamente 14 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 16 meses, aproximadamente 17 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, 55 aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, o aproximadamente 10 años. En ciertas modalidades, la supervivencia libre de progresión del paciente se extiende durante más de 14 meses.

60 50 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para reducir el tamaño del tumor al menos en 10 % en un paciente humano afectado por un tumor maligno que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la administración reduce el tamaño del tumor al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, 65 aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o 100 % comparado con el tamaño del tumor antes de la administración. En algunas modalidades, se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, se identifica al paciente que tiene un tumor maligno

- negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el paciente experimenta (i) una supervivencia libre de progresión extendida durante más de 12 meses, (ii) una reducción del tamaño del tumor de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, o aproximadamente 50 % comparado con el tamaño del tumor antes de la administración, o (iii) ambas.
- El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para aumentar una tasa de respuesta objetivo para un tratamiento contra el cáncer que va a ser mayor que 50 % en una población de pacientes humanos, cada uno de los cuales está afectado por un tumor maligno, a un tratamiento contra el cáncer que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la tasa de respuesta objetivo es mayor que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, o 75 %. En algunas modalidades, se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración.
- El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para aumentar una tasa de control de la enfermedad que va a ser mayor que 50 % en una población de pacientes humanos, cada uno de los cuales está afectado por un tumor maligno, a un tratamiento contra el cáncer que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la tasa de respuesta objetivo es mayor que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, o 75 %. En algunas modalidades, se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, la duración media de la respuesta es \geq 3 meses, \geq 6 meses, \geq 12 meses, o \geq 18 meses.
- En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar cada paciente de la población de pacientes que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar cada paciente de la población de pacientes que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar cada paciente de la población de pacientes que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, cada paciente de la población de pacientes se caracteriza además por (i) una supervivencia libre de progresión extendida durante más de 12 meses, (ii) una reducción del tamaño del tumor de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, o aproximadamente 50 % comparado con el tamaño del tumor antes de la administración, o (iii) ambas. En algunas modalidades, la población de pacientes comprende al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 pacientes que tienen un tumor maligno positivo a LAG-3.
- La selección de un paciente humano adecuado para una terapia de combinación de la invención puede comprender: identificar un paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3; e instruir un proveedor de atención médica para que administre al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la administración trata el tumor maligno.
- En algunas modalidades, identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 comprende determinar la expresión de LAG-3 en el tumor maligno. En algunas modalidades, identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 comprende determinar la expresión de PD-L1 en el tumor maligno. En algunas modalidades, identificar al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 comprende determinar la expresión de PD-L1 en el tumor maligno. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 se determina revisando los resultados de un ensayo capaz de determinar la expresión de LAG-3. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 se determina revisando los resultados de un ensayo de inmunohistoquímica capaz de detectar la expresión de LAG-3. En algunas modalidades, la expresión de PD-L1 se determina revisando los resultados de un ensayo capaz de determinar la expresión de PD-L1. En algunas modalidades, la expresión de PD-L1 se determina revisando los resultados de un ensayo de inmunohistoquímica capaz de detectar la expresión de PD-L1.
- En ciertas modalidades, un tumor positivo a LAG-3 comprende al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos

- aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o 100 % de las células que expresan LAG-3. En ciertas modalidades, un tumor positivo a LAG-3 comprende al menos aproximadamente 1 % de las células que expresan LAG-3. En ciertas modalidades, un tumor positivo a LAG-3 comprende al menos aproximadamente 5 % de las células que expresan LAG-3. Las células que expresan LAG-3 comprenden los linfocitos infiltrantes del tumor. Las células que expresan LAG-3 son el número total de células. En otras modalidades, las células expresan LAG-3 sobre la superficie celular.
- 5 10 En algunas modalidades, el tumor maligno se selecciona del grupo que consiste de un cáncer de hígado, cáncer de los huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer oral, cáncer de la cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma no de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cánceres de inicio en la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, 15 20 angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de las células escamosas, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen aquellos inducidos por asbestos, neoplasias hematológicas que incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de las células B, linfoma de Hodgkin/linfoma de las células B mediastinal primario, linfomas no de Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoide crónica, linfoma folicular, linfoma de las células B grandes difusas, 25 30 linfoma de Burkitt, linfoma de las células grandes inmunoblásticas, linfoma linfoblástico de las células B germinales, linfoma de las células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma de las células grandes anaplásicas, linfoma de las células T, y linfoma linfoblástico de las células T germinales, y cualquier combinación de los mismos.
- 35 En algunas modalidades, el tumor maligno se selecciona del melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), un tumor relacionado con el virus del papiloma humano (VPH), y un adenocarcinoma gástrico.
- En algunas modalidades, el tumor maligno es el NSCLC, un tumor relacionado con el cáncer relacionado con el virus, o adenocarcinoma gástrico.
- En algunas modalidades, el tumor maligno es el melanoma, cáncer gástrico, cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello, o cáncer de las células renales.
- 40 45 En algunas modalidades, el tumor maligno es el cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer gástrico, o carcinoma hepatocelular.
- En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor de melanoma que comprende aproximadamente 1 % o más de las células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.
- 50 55 En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor de cáncer gástrico que comprende aproximadamente 1 % o más de las células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.
- En algunas modalidades, el tumor maligno es refractario al tratamiento con un inhibidor del punto de control inmunológico. En algunas modalidades, el tumor maligno es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el tumor maligno es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-L1.
- 60 65 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para tratar el melanoma en un paciente humano, que comprende: identificar al paciente que tiene un melanoma positivo a LAG-3; y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, la identificación del paciente que tiene un melanoma positivo a LAG-3 comprende determinar la expresión de LAG-3 en el tumor de melanoma. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 se determina revisando los resultados de un ensayo capaz de determinar la expresión de LAG-3. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 se determina por medio de un ensayo de inmunohistoquímica capaz de detectar la expresión de LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3.

- En algunas realizaciones del inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención, el método para tratar un melanoma en un paciente humano que lo necesita comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica al paciente que tiene un melanoma positivo a LAG-3 antes de la administración. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en un método para extender un período de supervivencia libre de progresión durante más de 12 meses en un paciente humano afectado por un melanoma que comprende administrar al paciente un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica al paciente que tiene un melanoma positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde el paciente demuestra una supervivencia libre de progresión durante más de 12 meses. En algunas modalidades, se identifica al paciente que tiene un melanoma positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, se identifica al paciente que tiene un melanoma negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración.
- El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en un método para aumentar una tasa de respuesta objetivo para un tratamiento contra el cáncer que va a ser mayor que 15 % en una población de pacientes humanos, cada uno de los cuales está afectado por el melanoma, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la tasa de respuesta objetivo es mayor que 15 %. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en un método para aumentar una tasa de control de la enfermedad para un tratamiento contra el cáncer que va a ser mayor que 70 % en una población de pacientes humanos, cada uno de los cuales está afectado por el melanoma, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica cada paciente que tiene un melanoma positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la tasa de respuesta objetivo es mayor que 70 %. En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además identificar cada paciente de la población de pacientes que tiene un melanoma positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, la duración media de la respuesta es ≥ 3 meses, ≥ 6 meses, ≥ 12 meses, o ≥ 18 meses. En algunas modalidades, se identifica cada paciente que tiene un melanoma positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, se identifica cada paciente que tiene un melanoma negativo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración.
- En algunas modalidades, el melanoma es refractario al tratamiento con un inhibidor del punto de control inmunológico. En algunas modalidades, el melanoma es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-1 o un anticuerpo de anti-PD-L1.
- En algunas modalidades, la determinación del nivel de expresión de LAG-3 y/o de PD-L1 comprende proporcionar una muestra del tejido de prueba obtenida del paciente, la muestra del tejido de prueba comprende las células del tumor y/o las células inmunológicas infiltrantes del tumor. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una biopsia del tumor. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra intercalada en parafina fijada en formalina (FFPE, por sus siglas en inglés).
- En algunas modalidades, la determinación comprende detectar la expresión de ARN o de la proteína de LAG-3 y/o de PD-L1 en la muestra del tejido de prueba.
- En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 y/o de PD-L1 se detecta por medio de un ensayo capaz de detectar el nivel de la proteína de LAG-3 y/o de PD-L1, respectivamente, en la muestra del tejido de prueba.
- En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 y/o de PD-L1 se detecta por medio de un ensayo de inmunohistoquímica. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo monoplex (ensayo diseñado para detectar/medir la presencia de un solo analito, por ejemplo, un par de antígeno/anticuerpo). En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo multiplex (ensayo diseñado para detectar/medir múltiples analitos, ya sea simultánea o secuencialmente). En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende poner en contacto la muestra del tumor con el anticuerpo monoclonal de LAG-3 anti-humano 17B4, SP346, 11E3, 874501, o EPR4392(2). En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende poner en contacto la muestra del tumor con un anticuerpo de anti-LAG-3 que comprende regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:3 y 5, respectivamente.
- En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno negro o marrón. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno rojo. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno azul. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno verde. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno púrpura. En ciertas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno amarillo.
- En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa a una baja amplificación (por ejemplo, 4X o 10X). En algunas modalidades, la baja amplificación es de aproximadamente 20X.
- En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa a una alta amplificación. En algunas modalidades, la alta amplificación es de aproximadamente 40X, o mayor (60X, 100X).

En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa por medio un software de análisis de imágenes. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es calificado manualmente por un patólogo.

- 5 En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células del tumor en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células del tumor en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1. En algunas
- 10 modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células inmunológicas en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células inmunológicas en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células T en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1.
- 15 En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T CD8+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células T CD8+ en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T CD4+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células T CD4+ en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1.
- 20 En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T FOXP3+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 y/o evaluar la proporción de las células T FOXP3+ en la muestra del tejido de prueba que expresa PD-L1.
- 25 En algunas modalidades, las células con localización del LAG-3 citoplásmico/de la membrana parcial se evalúan como células que expresan LAG-3. En algunas modalidades, las células con localización del LAG-3 semejante a puntos se evalúan como células que expresan LAG-3. En algunas modalidades, las células con localización del LAG-3 citoplásmico/de la membrana completa se evalúan como células que expresan LAG-3. En algunas modalidades, las células con cualquier patrón de localización del LAG-3 se evalúan como células que expresan LAG-3.
- 30 En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo multiplex que comprende además detectar la expresión de MHC clase II por medio de las células del tumor. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa MHC clase II. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células no inmunológicas en la muestra del tejido de prueba que expresa MHC II.
- 35 En algunas modalidades, la expresión de la proteína de LAG-3 y/o de PD-L1 se detecta por medio de la citometría de flujo. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba obtenida del paciente comprende células inmunológicas infiltrantes del tumor. En algunas modalidades, el tumor maligno es una neoplasia maligna hematológica y la muestra del tejido comprende linfocitos circulantes. En algunas modalidades, la citometría de flujo es un ensayo multiplex. En
- 40 algunas modalidades, la citometría de flujo comprende detectar la expresión de los marcadores que comprenden LAG-3, PD-L1, CD4, CD8, FOXP3, MHC clase II y cualquier combinación de los mismos.
- 45 En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T CD8+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T CD4+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T FOXP3+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3.
- 50 En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 y/o de PD-L1 se detecta por medio de un ensayo capaz de detectar el nivel de ARN de LAG-3 y/o de PD-L1, respectivamente, en la muestra del tumor. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 y/o de PD-L1 se detecta por medio de un ensayo basado en RT-PCR. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo basado en RT-PCR comprende evaluar el nivel de expresión de ARN de LAG-3 y/o de PD-L1 en la muestra del tejido de prueba en relación con un nivel predeterminado.
- 55 En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 es un anticuerpo biespecífico.
- 60 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden (a) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:7; (b) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:8; (c) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:9; (d) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:10; (e) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:11; y (f) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:12.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:3 y 5, respectivamente.

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 es MK-4280 (28G-10), REGN3767, GSK2837781, IMP731 (H5L7BW), BAP050, IMP-701 (LAG-525), IMP321, FS-118, Sym022, TSR-033, MGD013, FS118, o GSK2831781.

En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden (a) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:23; (b) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:24; (c) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:25; (d) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:26; (e) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:27; y (f) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:28.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden cadenas ligeras y pesadas que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:17 y 18, respectivamente.

- 25 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475), pidilizumab (CT-011), o nivolumab (OPDIVO; BMS-936558).

En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 es atezolizumab (Tecentriq o RG7446), durvalumab (Imfinzi o MEDI4736), avelumab (Bavencio) o BMS-936559.

En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L2 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

35 En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CTLA-4, un antagonista de CD80, un antagonista de CD86, un antagonista de Tim-3, un antagonista de TIGIT, un antagonista de CD20, un antagonista de CD96, un antagonista de IDO1, un antagonista de STING, un antagonista de GARP, un antagonista de CD40, un antagonista de A2aR, un antagonista de CEACAM1 (CD66a), un antagonista de CEA, un antagonista de CD47, un antagonista de PVRIG, un antagonista de TDO, un antagonista de VISTA, o un antagonista de KIR.

40 En algunas modalidades, el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 a una dosis de 3, 20, 80, 160, o 240 mg.

45 En algunas modalidades, el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-1 a una dosis de 80 o 240 mg.

50 En algunas modalidades, el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-L1 a una dosis de 3, 20, 80, 160, o 240 mg.

55 En algunas modalidades, el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 a una dosis de 3, 20, 80, 160, o 240 mg y se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-1 a una dosis de 80 o 240 mg.

60 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a las siguientes dosis: (a) 3 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 80 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (b) 3 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (c) 20 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (d) 80 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 160 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (e) 80 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (f) 160 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1, o (g) 240 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1.

65 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a la dosis de 80 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 160 mg del anticuerpo de anti-PD-1.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a la dosis de 80 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a la dosis de 160 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1.

En algunas modalidades, los anticuerpos de anti-PD-1 y de anti-LAG-3 o los fragmentos de unión a los antígenos de los mismos son formulados para la administración intravenosa.

10 En algunas modalidades, los anticuerpos de anti-PD-1 y de anti-LAG-3 o los fragmentos de unión a los antígenos de los mismos son formulados conjuntamente. En algunas modalidades, los anticuerpos de anti-PD-1 y de anti-LAG-3 o los fragmentos de unión a los antígenos de los mismos son formulados por separado.

15 En algunas modalidades, el tratamiento consiste de hasta 12 ciclos.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran en los días 1, 15, 29, y 43 de cada ciclo.

20 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran en los días 1, 15, 29, y 43 de cada ciclo.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran antes de la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran dentro de aproximadamente 30 minutos antes de la administración del anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran después de la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran antes de la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se administran simultáneamente con el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 se administran como una primera línea del tratamiento. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 se administran como una segunda línea del tratamiento.

30 En algunas modalidades, un método descrito aquí comprende además la administración de al menos un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, al menos un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, al menos un agente terapéutico adicional es un inhibidor del punto de control inmunológico.

35 En algunas modalidades, el método produce al menos un efecto terapéutico seleccionado de una reducción en el tamaño de un tumor, una reducción en el número de lesiones metastásicas durante el transcurso del tiempo, una respuesta completa, una respuesta parcial, y una enfermedad estable.

40 En algunas modalidades, la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o el fragmento de unión al antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 activa las células T del paciente. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o el fragmento de unión al antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 induce la expresión de los marcadores de activación por medio de las células T del paciente.

45 En algunas modalidades, la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o el fragmento de unión al antígeno del mismo conduce a la ocupación de al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o aproximadamente 100 % de los receptores de LAG-3 en las células T del paciente. En algunas modalidades, las células T son células T CD8+. En algunas modalidades, las células T son células T infiltrantes del tumor.

50 En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 comprende un anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

55 Otro aspecto descrito pero no reivindicado aquí se refiere a un kit para su uso en un método de tratamiento de un paciente humano afectado por un tumor maligno, en donde el paciente se predice que responde al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positiva para LAG-3 y en donde la muestra es positiva para LAG-3

cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor, el kit que comprende: una dosificación que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal de un anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una dosificación que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal de un anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; e instrucciones para usar el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 o los fragmentos de unión a los antígenos de los mismos en cualquiera de los métodos descritos aquí.

5 Un método ilustrativo para identificar a un paciente que es refractario al tratamiento con un antagonista de PD-1 comprende determinar el nivel de expresión de LAG-3, en donde un nivel aumentado de la expresión de LAG-3 después del tratamiento con el antagonista de PD-1, en relación con el nivel de expresión de LAG-3 antes del tratamiento con el antagonista de PD-1, indica que un paciente es refractario a la terapia con el antagonista de PD-1. Un método ilustrativo para identificar a un paciente que está en riesgo de volverse refractario al tratamiento con un antagonista de PD-1 que comprende determinar el nivel de expresión de LAG-3, en donde un nivel aumentado de la expresión de LAG-3 después del tratamiento con el antagonista de PD-1, en relación con el nivel de expresión de LAG-3 antes del tratamiento con el antagonista de PD-1, indica que un paciente está en riesgo de volverse refractario a la terapia con el antagonista de PD-1. Un método ilustrativo para identificar un paciente que probablemente responda a una terapia con LAG-3 comprende determinar el nivel de expresión de LAG-3 en el paciente, en donde un nivel aumentado de la expresión de LAG-3 después del tratamiento con un antagonista de PD-1, en relación con el nivel de expresión de LAG-3 antes del tratamiento con el antagonista de PD-1, indica que es probable que un paciente responda a una terapia con LAG-3. Un método ilustrativo de selección de un paciente para el tratamiento con una terapia con LAG-3 comprende determinar el nivel de expresión de LAG-3 en el paciente, en donde un nivel aumentado de la expresión de LAG-3 después del tratamiento con el antagonista de PD-1, en relación con el nivel de expresión de LAG-3 antes del tratamiento con el antagonista de PD-1, indica que es probable que un paciente responda a una terapia con LAG-3. En una modalidad, el antagonista de PD-1 es un inhibidor de PD-1. En ciertas modalidades, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo de PD-1. En algunas modalidades, la terapia con LAG-3 es un inhibidor de LAG-3. En las modalidades particulares, la terapia con LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3. En una modalidad, la terapia con LAG-3 es una terapia de combinación. En una modalidad, la terapia de combinación con LAG-3 es una combinación de un anticuerpo de anti-LAG-3 y un anticuerpo de anti-PD-1.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Patrones de tinción observados en las muestras de inmunohistoquímica (IHC) de LAG-3 monoplex.

35 Figura 2. Distribución de la frecuencia de las células LAG-3+ como una proporción de las células del tumor totales en una muestra analizada con IHC de LAG-3 monoplex.

Figura 3A. Diseño del estudio y puntos finales. Figura 3B. Criterios de elegibilidad claves para los pacientes en la cohorte de expansión de IO antes del melanoma.

Figura 4. Características demográficas y de la enfermedad de la línea base.

Figura 5. Terapia previa.

40 Figura 6. Estado de expresión de LAG-3 de los primeros 40 melanomas que experimentan IO.

Figura 7. Respuesta por la evaluación del investigador de los pacientes con melanoma que progresaron en la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa.

Figura 8. La expresión de LAG-3 enriquece la respuesta.

Figura 9. Intensidad y duración de la respuesta por la expresión de LAG-3.

45 Figura 10. Duración de la supervivencia libre de progresión.

Figura 11. Respuesta por las características de la línea base (investigador evaluado).

Figura 12. Estado de expresión de LAG-3 de las muestras del tumor gástrico. El 48 % (10/21) de las muestras se evaluaron como positivas a LAG-3 usando un punto de corte de 1 % en un ensayo de IHC monoplex.

50 Figura 13. Cambio en el tamaño de la lesión objetivo en los pacientes con cáncer gástrico en respuesta al tratamiento con una combinación de anticuerpos de anti-LAG-3 y de anti-PD-1. Los tumores positivos a LAG-3 se enriquecieron entre los pacientes que respondieron al tratamiento. La respuesta del tumor se determinó de acuerdo con RECIST. Los pacientes en este estudio no han sido expuestos previamente al tratamiento con anti-PD-1/PD-L1.

55 Figura 14. Estado de expresión de LAG-3 del cáncer de las células escamosas de la cabeza y cuello (SCCHN), carcinoma renal, carcinoma hepatocelular (HCC), y muestras del tumor de NSCLC como se determina por medio de un ensayo de IHC monoplex.

Figura 15A. Secciones del melanoma pigmentado. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina con o sin blanqueamiento. Figura 15B. IHC de LAG-3 del melanoma pigmentado con o sin blanqueamiento previo. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina.

60 Figura 16. Diseño del estudio y puntos finales actualizados.

Figura 17. Características demográficas de la línea base y de la enfermedad actualizadas.

Figura 18. Terapias previas actualizadas.

Figura 19. Actividad antitumoral actualizada de la terapia de combinación de BMS-986016 y Nivolumab.

Figura 20. Respuesta actualizada por las características de la línea base y la expresión de LAG-3.

65 Figura 21. Cambio mejor actualizado en el tamaño de la lesión objetivo por la expresión de LAG-3 y de PD-L1.

Figura 22. Intensidad y duración actualizadas de la respuesta por la expresión de LAG-3 y de PD-L1.

Figura 23. Seguimiento clínico en curso actualizado.

Figura 24. Papel del LAG-3 y del PD-1 en el agotamiento de las células T y utilidad clínica propuesta de la combinación con nivolumab.

5 Figura 25. Patrones de expresión de LAG-3 por la tinción de IHC de las células nucleadas totales en una muestra del tumor de melanoma.

Figuras 26A-26F. Asociación del LAG-3 con los biomarcadores inmunológicos e inflamatorios: figura 26A LAG-3 contra CD8, figura 26B LAG-3 contra FOXP3, figura 26C LAG-3 contra CD163, figura 26D LAG-3 contra CD68, figura 26E LAG-3 contra PD-L1, figura 26F LAG-3 contra MHC II.

10 Figura 27. Proporción de los linfocitos infiltrantes del tumor positivo a LAG-3 (TIL) en los tumores que comprenden < 1 % o \leq 1 % de las células del tumor positivas a MHC II.

Figuras 28A - 28C. Relación entre los grupos de inflamación y la expresión de los biomarcadores en (fig. 28A) el cáncer urotelial, (fig. 28B) NSCLC, y (fig. 28C) todos los tipos de tumores.

Figuras 29A - 29C. Expresión de las células del tumor de MHC II heterogéneas y LAG-3 + TIL. Figura 29A. Números de LAG-3 + TIL en las regiones de las células del tumor de bajo MHC II y de alto MHC II en el carcinoma urotelial.

15 Figuras 29B y 29C. Proporción de las células de LAG-3 + TIL en las regiones de las células del tumor de bajo MHC II y de alto MHC II en las muestras del carcinoma urotelial y gástrico.

Figuras 30A y 30B. Niveles de ARNm de LAG-3 en la selección y en las semanas 2-4 de la monoterapia con nivolumab.

20 Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor o un anticuerpo para su uso en un método mejorado de tratamiento para tumores malignos en un paciente humano. En particular, la presente invención muestra que la administración de un anticuerpo de anti-LAG-3 en combinación con un anticuerpo de anti-PD-1 logra resultados del tratamiento sorprendentemente mejorados en una población de pacientes que tienen un tumor maligno positivo a LAG-3 comparado con una población que comprende pacientes que tienen tumores tanto positivos a LAG-3 como negativos a LAG-3. De acuerdo con esto, se describe aquí un método para identificar patentes que tienen un tumor positivo a LAG-3, por ejemplo, melanoma. En un aspecto, la invención descrita aquí se refiere a un inhibidor o un anticuerpo para su uso en un método para tratar un tumor maligno positivo a LAG-3 por medio de la administración de una combinación de un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1), como se define en las reivindicaciones adjuntas.

1. Definiciones

35 Para que la presente descripción pueda ser entendida más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Como se usan en esta solicitud, excepto que se provean aquí expresamente de otra manera, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se establece a continuación. Se establecen definiciones adicionales en toda la solicitud.

40 Un "anticuerpo" (Ab) incluirá, sin limitación, una inmunoglobulina de glicoproteína que se une específicamente a un antígeno y comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, o una parte de unión al antígeno de la misma. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios constantes, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio constante, C_L . Las regiones de V_H y de V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones del marco (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, colocadas desde el extremo de amino hasta el extremo de carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden tener un papel mediador en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedero, que incluyen varias células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Una cadena pesada puede tener la lisina C-terminal o no. A menos que se especifique aquí de otra manera, los aminoácidos en las regiones variables se numeran usando el sistema de numeración de Kabat y aquellos de las regiones constantes se numeran usando el sistema de la UE.

Una inmunoglobulina se puede derivar de cualquiera de los isótipos comúnmente conocidos, incluyendo, pero sin estar limitados a, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por aquellas personas expertas en la técnica e incluyen, pero no están limitadas a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. "Isótipo" se refiere a la clase o subclase del anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de cadena pesada. El término "anticuerpo" incluye, a manera de ejemplo, anticuerpos monoclonales y polyclonales; anticuerpos químicos y humanizados; anticuerpos humanos o no humanos; anticuerpos totalmente sintéticos; y anticuerpos de una sola cadena. Un anticuerpo no humano puede ser humanizado por medio de los métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el ser humano. En donde no se establezca expresamente, y a menos que el contexto lo indique de otra manera, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoespecíficos,

biespecíficos, o multiespecíficos, así como un anticuerpo de una sola cadena. En las modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico.

5 Como se usa aquí, un "anticuerpo de IgG" tiene la estructura de un anticuerpo de IgG que está presente de manera natural, es decir, tiene el mismo número de cadenas ligeras y pesadas y de enlaces de disulfuro que un anticuerpo de IgG que está presente de manera natural de la misma subclase. Por ejemplo, un anticuerpo de anti-ICOS IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 consiste de dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC), en donde las dos cadenas pesadas y cadenas ligeras están unidas por el mismo número y ubicación de los puentes de disulfuro que ocurren en los anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que están presentes de manera natural, respectivamente (a menos que el anticuerpo haya mutado para modificar los enlaces de disulfuro).

10 Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigenicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de PD-1). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 puede tener una reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de PD-1 de diferentes especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos.

15 20 El anticuerpo puede ser un anticuerpo que ha sido alterado (por ejemplo, por mutación, supresión, sustitución, conjugación con una porción diferente del anticuerpo). Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir uno o más aminoácidos variantes (comparado con un anticuerpo que está presente de manera natural) que cambian una propiedad (por ejemplo, una propiedad funcional) del anticuerpo. Por ejemplo, se conocen numerosas de tales alteraciones en la técnica que afectan, por ejemplo, la semivida, la función efectora y/o las respuestas inmunológicas al anticuerpo en un paciente. El término anticuerpo también incluye construcciones de polipéptidos artificiales que comprenden al menos un sitio de unión al antígeno derivado del anticuerpo.

25 30 El término "anticuerpo monoclonal" ("mAb") se refiere a una preparación que no está presente de manera natural de moléculas del anticuerpo de una sola composición molecular, es decir, moléculas del anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas, y que exhiben una sola especificidad y afinidad de unión para un epítopo particular. Un mAb es un ejemplo de un anticuerpo aislado. Los MAb se pueden producir por medio de las técnicas de hibridoma, recombinantes, transgénicas u otras, conocidas por las personas expertas en la técnica.

35 40 Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto las regiones del marco como de CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica para el sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa aquí, no está propuesto para incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias del marco humanas. Los términos anticuerpos "humanos" y anticuerpos "completamente humanos" se usan como sinónimos.

45 50 Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos fuera de los dominios de CDR de un anticuerpo no humano son reemplazados con los aminoácidos correspondientes derivados de las inmunoglobulinas humanas. En una modalidad de una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos fuera de los dominios de CDR han sido reemplazados con los aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos dentro de una o más regiones de CDR no han cambiado. Son permisibles pequeñas adiciones, supresiones, inserciones, sustituciones o modificaciones de los aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno particular. Un anticuerpo "humanizado" retiene una especificidad antigenica semejante a aquella del anticuerpo original.

55 Un "anticuerpo químérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de una especie y las regiones constantes se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes se derivan de un anticuerpo humano.

60 65 Un anticuerpo de "anti-antígeno" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1 se une específicamente a PD-1 y un anticuerpo de anti-LAG-3 se une específicamente a LAG-3.

Una "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo (también llamada "fragmento de unión al antígeno") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo completo. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo por medio de los fragmentos o partes de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados dentro del término "parte de unión al antígeno" o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, por

ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3 descrito aquí, incluyen:

- (1) un fragmento de Fab (fragmento de la escisión de la papaína) o un fragmento monovalente semejante que consiste de los dominios de VL, VH, LC y CH1;
- 5 (2) un fragmento de F(ab')2 (fragmento de la escisión de la pepsina) o un fragmento bivalente semejante que comprende dos fragmentos de Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de articulación;
- (3) un fragmento de Fd que consiste de los dominios de VH y de CH1;
- (4) un fragmento de Fv que consiste de los dominios de VL y de VH de una sola ramificación de un anticuerpo,
- 10 (5) un fragmento de un anticuerpo de un solo dominio (dAb) (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-46), que consiste de un dominio de VH;
- (6) un anticuerpo de bidominio único que consiste de dos dominios de VH unidos por una articulación (anticuerpos de redirecciónamiento de doble afinidad (DART));
- (7) una inmunoglobulina de dominio variable doble;
- 15 (8) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR); y
- (9) una combinación de dos o más CDR aisladas, que opcionalmente se pueden unir por medio un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento de Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, los mismos se pueden unir, usando métodos recombinantes, por medio de un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones de VL y de VH se agrupan por pares para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* 20 (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de una sola cadena también están propuestos para estar abarcados dentro del término "parte de unión al antígeno" o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos del anticuerpo se obtienen usando las técnicas convencionales conocidas por las personas expertas en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las partes de unión al antígeno se pueden producir 25 por medio de las técnicas de ADN recombinante, o por medio de la escisión enzimática o química de las inmunoglobulinas intactas.

Los términos "LAG-3", "LAG3", o "gen 3 de activación de linfocitos" se refieren al gen 3 de activación de linfocitos. El término LAG-3 como se usa aquí incluye el LAG-3 humano (hLAG-3), variantes, isoformas, y homólogos de especies de hLAG-3, y análogos que tienen al menos un epítopo común con hLAG-3. El término LAG-3 como se usa aquí incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para una proteína de LAG-3 humana pueden reaccionar de manera cruzada, en ciertos casos, con una proteína de LAG-3 de una especie diferente a la del ser humano. En otras modalidades, los anticuerpos específicos para una proteína de LAG-3 humana pueden ser completamente específicos para la proteína de LAG-3 humana y pueden no exhibir 30 especies u otros tipos de reactividad cruzada, o pueden reaccionar de manera cruzada con el LAG-3 de ciertas otras especies, pero no todas las demás especies (por ejemplo, reaccionan de manera cruzada con el LAG-3 de mono pero no con el LAG-3 de ratón). El término "LAG-3 humano" se refiere al LAG-3 de la secuencia humana, tal como la secuencia de aminoácidos completa del LAG-3 humano que tiene el número de acceso de GenBank NP_002277 (SEC ID NO:13). El término "LAG-3 de ratón" se refiere al LAG-3 de la secuencia de ratón, tal como la secuencia de 35 aminoácidos completa del LAG-3 de ratón que tiene el número de acceso de GenBank NP_032505. El LAG-3 también ya se conoce en la técnica como, por ejemplo, CD223. La secuencia del LAG-3 humano puede diferir del LAG-3 humano del número de acceso de GenBank NP_002277 porque tiene, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y el LAG-3 tiene sustancialmente la misma función biológica que el LAG-3 humano del número de acceso de GenBank NP_002277. Por ejemplo, una función biológica del LAG-3 humano es 40 que tiene un epítopo en el dominio extracelular del LAG-3 que está unido específicamente por un anticuerpo de la presente descripción o una función biológica del LAG-3 humano es que se une a las moléculas de MHC clase II.

Una secuencia del LAG-3 humano particular será generalmente al menos 90 % idéntica en la secuencia de aminoácidos al LAG-3 humano del número de acceso de GenBank NP_002277 y contiene residuos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos que es humana cuando se compara con las secuencias de aminoácidos del LAG-3 de otras especies (por ejemplo, de murino). En ciertos casos, un LAG-3 humano puede ser al menos 95 %, o incluso al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos al LAG-3 del número de acceso de GenBank NP_002277. En ciertas modalidades, una secuencia del LAG-3 humano mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de LAG-3 del número de acceso de GenBank NP_002277. En ciertas 55 modalidades, el LAG-3 humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos desde la secuencia de LAG-3 del número de acceso de GenBank NP_002277. La identidad por porcentaje se puede determinar como se describe aquí.

Como se usan aquí, los términos "muerte programada 1", "muerte celular programada 1", "proteína de PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" y "hPD-1" se usan intercambiablemente, e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de la PD-1 humana, y análogos que tienen al menos un epítopo común con PD-1. La secuencia completa de PD-1 se puede encontrar bajo el número de acceso de GenBank U64863 (SEC ID NO:29).

La muerte programada 1 (PD-1) de la proteína es un elemento inhibidor de la familia CD28 de receptores, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en las células B activadas, células T y células mieloides (Agata *et al.*, Supra; Okazaki *et al.* (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett *et al.* (2003) *J Immunol* 170:711-8).

- Los elementos iniciales de la familia, CD28 e ICOS, fueron descubiertos por los efectos funcionales en el aumento de la proliferación de las células T después de la adición de los anticuerpos monoclonales (Hutloff *et al.* *Nature* (1999); 397:263-266; Hansen *et al.* *Immunogenetics* (1980); 10:247-260). PD-1 se descubrió a través de la selección para la expresión diferencial en las células apoptóticas (Ishida *et al.* *EMBO J* (1992); 11:3887-95). Los otros elementos de la familia, CTLA-4 y BTLA, fueron descubiertos a través de la selección para la expresión diferencial en los linfocitos T citotóxicos y las células TH1, respectivamente. CD28, ICOS y CTLA-4 tienen un residuo de cisteína no agrupado por pares que permite la homodimerización. En contraste, se sugiere que PD-1 existe como un monómero, que carece del residuo de cisteína no agrupado por pares característico en otros elementos de la familia CD28.
- 5 10 El gen de PD-1 es una proteína de transmembrana del tipo I de 55 kDa que forma parte de la superfamilia del gen de Ig (Agata *et al.* (1996) *Int Immunol* 8:765-72). PD-1 contiene una porción inhibidora de tirosina del inmunorreceptor proximal de la membrana (ITIM) y una porción de cambio basada en tirosina distal de la membrana (ITSM) (Thomas, ML (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E y Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Aunque es estructuralmente semejante a CTLA-4, PD-1 carece de la porción de MYPPPY (SEC ID NO:32) que es crítica para la unión de B7-1 y B7-2. Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, que han mostrado que regulan negativamente la activación de las células T durante la unión a PD-1 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter y *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Tanto PD-L1 como PD-L2 son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero que no se unen a otros elementos de la familia CD28. PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 conduce a una reducción en los linfocitos infiltrantes del tumor, a una reducción en la proliferación mediada por el receptor de las células T, y a la evasión inmunológica por medio de las células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La supresión inmunológica se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 es bloqueada también (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).
- 15 20 25 De manera consistente con que PD-1 es un elemento inhibidor de la familia CD28, los animales deficientes en PD-1 desarrollan varios fenotipos autoinmunológicos, incluyendo la miocardiopatía autoinmunológica y un síndrome semejante al lupus con artritis y nefritis (Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura *et al.* (2001) *Science* 291:319-22). Además, se ha descubierto que PD-1 desempeña un papel en la encefalomielitis autoinmunológica, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), la diabetes tipo I y la artritis reumatoide (Salama *et al.* (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina y Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen *et al.* (2004) *Lupus* 13:510). En una línea del tumor de células B de murino, se mostró que la ITSM de PD-1 va a ser esencial para bloquear el flujo de Ca.sup.2+ mediado por BCR y la fosforilación de la tirosina de las moléculas efectoras corriente abajo (Okazaki *et al.* (2001) *PNAS* 98:13866-71).
- 30 35 El "ligando 1 de muerte programada (PD-L1)" es uno de los dos ligandos de glucoproteína de la superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regulan negativamente la activación de las células T y la secreción de citoquinas durante la unión a PD-1. El término "PD-L1", como se usa aquí, incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas y homólogos de las especies de hPD-L1, y 5 análogos que tienen al menos un epítopo común con hPD-L1. La secuencia completa de hPD-L1 se puede encontrar bajo el número de acceso de GenBank Q9NZQ7.
- 40 Los términos "ligando 2 de muerte programada" y "PD-L2" como se usan aquí incluyen PD-L2 humano (hPD-L2), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-L2, y análogos que tienen al menos un epítopo común con hPD-L2. La secuencia completa de hPD-L2 se puede encontrar bajo el número de acceso de GenBank Q9BQ51.
- 45 Un "paciente" como se usa aquí incluye cualquier paciente que está afectado por un cáncer (por ejemplo, melanoma). Los términos "sujeto" y "paciente" se usan intercambiablemente aquí.
- 50 55 60 65 "Administración" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por aquellas personas expertas en la técnica. Las rutas de administración para las formulaciones descritas aquí incluyen rutas de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, espinal u otras parenterales, por ejemplo, por medio de una inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se usa aquí, significa los modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, usualmente por medio de una inyección, e incluye, sin limitación, una inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralifática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtracheal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como una electroporación *in vivo*. En algunas modalidades, la formulación se administra a través de una ruta no parenteral, en algunas modalidades, oralmente. Otras rutas no parenterales incluyen una ruta de administración tópica, epidérmica o por las mucosas, por ejemplo, de manera intranasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también se puede llevar a cabo, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos extendidos.
- 70 "Tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso llevado a cabo en, o a la administración de un agente activo a, el sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir el inicio, progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación o afección, o los indicios

bioquímicos asociados con una enfermedad.

Como se usa aquí, "tratamiento efectivo" se refiere al tratamiento que produce un efecto beneficioso, por ejemplo, la mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno. Un efecto beneficioso puede tomar la forma de una mejora sobre la línea base, es decir, una mejora sobre una medición u observación llevada a cabo antes del inicio de la terapia de acuerdo con el método. Un efecto beneficioso también puede tomar la forma de una detención, ralentización, retardo, o estabilización de una progresión perjudicial de un marcador del tumor sólido. El tratamiento efectivo se puede referir al alivio de al menos un síntoma de un tumor sólido. Tal tratamiento efectivo puede reducir, por ejemplo, el dolor del paciente, reducir el tamaño y/o el número de lesiones, puede reducir o prevenir la metástasis de un tumor y/o puede ralentizar el crecimiento del tumor.

El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un agente que proporciona el resultado biológico, terapéutico, y/o profiláctico deseado. Este resultado puede ser una reducción, mejora, paliación, disminución, retardo, y/o alivio de uno o más de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Con referencia a los tumores sólidos, una cantidad efectiva comprende una cantidad suficiente para provocar que un tumor se encoja y/o para reducir la tasa de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor) o para prevenir o retardar otra proliferación de las células no deseadas. En algunas modalidades, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para retardar el desarrollo del tumor. En algunas modalidades, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para prevenir o retardar la recurrencia del tumor. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones. La cantidad efectiva del fármaco o composición puede: (i) reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retardar, ralentizar en cierta medida y puede detener la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida) y puede detener la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento del tumor; (vi) prevenir o retardar la aparición y/o recurrencia del tumor; y/o (vii) aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En un ejemplo, una "cantidad efectiva" es la cantidad del anticuerpo de anti-LAG-3 y la cantidad de anticuerpo de anti-PD-1, en combinación, que se ha probado clínicamente que afecta una reducción significativa en el cáncer o que ralentiza la progresión del cáncer, tal como un tumor sólido avanzado. Como se usan aquí, los términos "dosis fijada", "dosis de respuesta plana" y "dosis de respuesta plana-fijada" se usan intercambiablemente y se refieren a una dosis que se administra a un paciente sin tener en cuenta el peso o el área de la superficie corporal (BSA) del paciente. Por lo tanto, la dosis fijada o de respuesta plana no es provista como una dosis en mg/kg, sino como una cantidad absoluta del agente (por ejemplo, el anticuerpo de anti-LAG-3 y/o el anticuerpo de anti-PD-1).

El término "supervivencia libre de progresión", que se puede abbreviar como SLP, como se usa aquí, se refiere al período de tiempo durante y después del tratamiento de un tumor sólido (es decir, melanoma) que un paciente vive con la enfermedad pero que no empeora.

"Intervalo de dosificación", como se usa aquí, significa la cantidad de tiempo que transcurre entre múltiples dosis de una formulación descrita aquí que se administra a un sujeto. Por consiguiente, el intervalo de dosificación puede estar indicado como intervalos.

El término "frecuencia de dosificación", como se usa aquí, se refiere a la frecuencia de las dosis de administración de una formulación descrita aquí en un tiempo dado. La frecuencia de dosificación se puede indicar como el número de dosis durante un tiempo dado, por ejemplo, una vez a la semana o una vez en dos semanas.

El uso del término "dosis fijada" con respecto a una composición de la invención significa que dos o más anticuerpos diferentes en una sola composición están presentes en la composición en proporciones particulares (fijadas) entre sí. En algunas modalidades, la dosis fijada se basa en el peso (por ejemplo, mg) de los anticuerpos. En ciertas modalidades, la dosis fijada se basa en la concentración (por ejemplo, mg/ml) de los anticuerpos. En algunas modalidades, la proporción es al menos aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:120, aproximadamente 1:140, aproximadamente 1:160, aproximadamente 1:180, aproximadamente 1:200, aproximadamente 200:1, aproximadamente 180:1, aproximadamente 160:1, aproximadamente 140:1, aproximadamente 120:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, o aproximadamente 2:1 mg de un primer anticuerpo con respecto a mg de un segundo anticuerpo. Por ejemplo, la proporción 3:1 de un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo puede significar que un vial puede contener aproximadamente 240 mg del primer anticuerpo y 80 mg del segundo anticuerpo o aproximadamente 3 mg/ml del primer anticuerpo y 1 mg/ml del segundo anticuerpo.

El uso del término "dosis de respuesta plana" con respecto a la composición de la invención significa una dosis que

se administra a un paciente sin tener en cuenta el peso o el área de la superficie corporal (BSA) del paciente. Por lo tanto, la dosis de respuesta plana no es provista como una dosis en mg/kg, sino como una cantidad absoluta del agente (por ejemplo, el anticuerpo de anti-LAG-3 y/o el anticuerpo de anti-PD-1). Por ejemplo, una persona de 60 kg y una persona de 100 kg podrían recibir la misma dosis de la composición (por ejemplo, 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1 y 80 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 en un solo vial de la formulación de dosificación fijada que contiene tanto 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1 como 80 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 (o dos viales de la formulación de dosificación fijada que contienen 120 mg de un anticuerpo de anti-PD-1 y 40 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3, etc.)).

5 10 El término "dosis basada en el peso" como es referido aquí significa que una dosis que se administra a un paciente se calcula con base en el peso del paciente. Por ejemplo, cuando un paciente con 60 kg de peso corporal requiere 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-LAG-3 en combinación con 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-PD-1, se pueden extraer las cantidades apropiadas del anticuerpo de anti-LAG-3 (es decir, 180 mg) y del anticuerpo de anti-PD-1 (es decir, 180 mg) de una sola vez a partir de una formulación de dosificación fijada de proporción 1:1 de un anticuerpo de anti-LAG3 y un anticuerpo de anti-PD-1.

15 20 Los términos "aproximadamente una vez por semana", "una vez aproximadamente cada semana", "una vez aproximadamente cada dos semanas" o cualesquiera otros términos de intervalo de dosificación semejantes como se usan aquí significan un número aproximado, y "aproximadamente una vez por semana" o "una vez aproximadamente cada semana" pueden incluir cada siete días \pm dos días, es decir, cada cinco días a cada nueve días. Por consiguiente, la frecuencia de dosificación de "una vez por semana" puede ser cada cinco días, cada seis días, cada siete días, cada ocho días, o cada nueve días. "Una vez aproximadamente cada dos semanas" puede incluir cada catorce días \pm tres días, es decir, cada once días a cada diecisiete días. Se aplican aproximaciones semejantes, por ejemplo, a una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas y una vez cada doce semanas. En algunas modalidades, un intervalo de dosificación de una vez cada seis semanas o una vez cada doce semanas significa que la primera dosis se puede administrar cualquier día de la primera semana, y luego la siguiente dosis se puede administrar cualquier día de la sexta o duodécima semana, respectivamente. En otras modalidades, un intervalo de dosificación de una vez aproximadamente cada seis semanas o una vez aproximadamente cada doce semanas significa que la primera dosis se administra en un día particular de la primera semana (por ejemplo, el lunes) y luego la siguiente dosis se administra el mismo día de la sexta o duodécima semana (es decir, el lunes), respectivamente.

25 30 35 Un "cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales en el cuerpo. La división y el crecimiento de las células no regulados conducen a la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis hasta partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. Un "cáncer" o "tejido canceroso" puede incluir un tumor.

40 45 50 55 60 El término "tumor", como se usa aquí, se refiere a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento o proliferación excesiva de las células, ya sea benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa), incluyendo las lesiones precancerosas. Los términos "positivo a LAG-3" o "positivo a la expresión de LAG-3", relacionados con la expresión de LAG-3, se refieren a la proporción de las células en una muestra del tejido de prueba que comprende las células del tumor y las células inflamatorias infiltrantes del tumor (por ejemplo, células T, células T CD8+, células T CD4+, células FOXP3+) por encima de las cuales la muestra del tejido es evaluada como una que expresa LAG-3. En algunas modalidades, para la expresión de LAG-3 ensayada por inmunohistoquímica (IHC), el tumor positivo a LAG-3 o tumor positivo a la expresión de LAG-3 significa que al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o 100 % del número total de células expresan LAG-3. El tumor positivo a LAG-3 o tumor positivo a la expresión de LAG-3 también se pueden expresar aquí como un tumor que expresa LAG-3. En algunas modalidades, un tumor positivo a la expresión de LAG-3 o positivo a LAG-3 significa que al menos aproximadamente 1 % del número total de células expresan LAG-3 sobre la superficie celular. En otras modalidades, un tumor positivo a la expresión de LAG-3 o positivo a LAG-3 significa que al menos aproximadamente 5 % del número total de células expresan LAG-3 sobre la superficie celular. En una modalidad particular, el tumor positivo a la expresión de LAG-3 o positivo a LAG-3 significa que en el intervalo de 1-5 % del número total de células expresan LAG-3 sobre la superficie celular.

65 70 Los términos "positivo a PD-L1" o "positivo a la expresión de PD-L1", relacionados con la expresión de PD-L1 sobre la superficie celular, se refieren a la proporción de las células en una muestra del tejido de prueba que comprende las células del tumor y las células inflamatorias infiltrantes del tumor por encima de las cuales la muestra es evaluada como una que expresa PD-L1 sobre la superficie celular. Para la expresión sobre la superficie celular analizada por inmunohistoquímica (IHC), por ejemplo, con el mAb 28-8, el tumor positivo a PD-L1 o tumor positivo a la expresión de PD-L1 significa que al menos aproximadamente 0,01 %, al menos aproximadamente 0,5 %, al menos

aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, o al menos 5) aproximadamente 30 % del número total de células expresan PD-L1. El tumor positivo a PD-L1 o tumor positivo a la expresión de PD-L1 también se puede expresar aquí como el tumor que expresa PD-L1. En otras modalidades, el tumor positivo a PD-L1 o tumor positivo a la expresión de PD-L1 significa que de al menos aproximadamente 0,1 % a 10) al menos aproximadamente 20 % del número total de células expresan PD-L1. En ciertas modalidades, el tumor positivo a PD-L1 o tumor positivo a la expresión de PD-L1 significa que de al menos aproximadamente 0,1 % a al menos aproximadamente 10 % del número total de las células expresan PD-L1. En algunas modalidades, el tumor positivo a la expresión de PD-L1 o positivo a PD-L1 significa que al menos aproximadamente 1 % del número total de 15) células expresan PD-L1 sobre la superficie celular. En otras modalidades, el tumor positivo a la expresión de PD-L1 o positivo a PD-L1 significa que al menos aproximadamente 5 % del número total de células expresan PD-L1 sobre la superficie celular. En una modalidad particular, el tumor positivo a la expresión de PD-L1 o positivo a PD-L1 significa que al menos aproximadamente 1 %, o en el intervalo de 1-5 %, del número total de células expresan PD-L1 sobre la superficie celular.

20) Los términos "negativo a PD-L1" o "negativo a la expresión de PD-L1", relacionados con la expresión de PD-L1 sobre la superficie celular, se refieren a la proporción de las células en una muestra del tejido de prueba que comprende las células del tumor y las células inflamatorias infiltrantes del tumor que no son positivas a PD-L1 o que no son positivas a la expresión de PD-L1.

25) Una "respuesta inmunológica" se refiere a la acción de una célula del sistema inmunológico (por ejemplo, los linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y neutrófilos) y a las macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (incluyendo los anticuerpos, las citoquinas y los productos de complemento) que conduce a la ubicación como un objetivo selectivo, la unión, el daño, la destrucción y/o la eliminación de los patógenos, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas u otras células anormales que invaden el cuerpo de un vertebrado o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

30) Una "célula inflamatoria infiltrante del tumor" es cualquier tipo de célula que típicamente participa en una respuesta inflamatoria en un sujeto y que se infiltra en el tejido del tumor. Tales células incluyen los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL), macrófagos, monocitos, eosinófilos, histiocitos y células dendríticas.

35) El término "y/o", en donde se usa aquí, se va a tomar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por consiguiente, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" aquí está propuesto para incluir "A y B", "A o B", "A" (solo), y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B, y/o C" está propuesto para abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

40) Se entiende que siempre que se describen aquí los aspectos con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan de otra manera los aspectos análogos descritos en los términos de "que consiste de" y/o "que consiste esencialmente de".

45) Los términos "aproximadamente" o "comprendido esencialmente de" se refieren a un valor o composición que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor o composición particular como lo determina una persona experta en la técnica, lo cual dependerá en parte de como se mide o determina el valor o la composición, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" o "comprendido esencialmente de" pueden significar dentro de 1 o más de 1 de la desviación estándar según la práctica en la técnica. De manera alternativa, "aproximadamente" o "comprendido esencialmente de" pueden significar un intervalo de hasta 10 % o 20 % (es decir, $\pm 10\%$ o $\pm 20\%$). Por ejemplo, aproximadamente 3 mg pueden incluir cualquier número entre 2,7 mg y 3,3 mg (para 10 %) o entre 2,4 mg y 3,6 mg (para 20 %). Además, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se establezca de otra manera, se debe suponer que el significado de "aproximadamente" o "comprendido esencialmente de" va a estar dentro de un intervalo de error aceptable para este valor o composición particular.

50) Como se describe aquí, se debe entender que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo descrito y, cuando sea apropiado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un entero), a menos que se indique de otra manera.

55) A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica con la que está relacionada esta descripción. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2/a. ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 5/a. ed., 2013, Academic Press; y el Oxford

Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 2006, Oxford University Press, proveen una persona experta con un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

- 5 Las unidades, prefijos y símbolos se denotan en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los títulos provistos aquí no son limitaciones de los diversos aspectos de la descripción, los cuales se pueden obtener haciendo referencia a la especificación en su conjunto. De acuerdo con esto, los términos definidos a continuación se definen más completamente con referencia a la especificación en su totalidad.
- 10 Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones.

2. Métodos de la invención

- 15 En un aspecto, el presente inhibidor o anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención útil en el tratamiento de un tumor maligno positivo a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) en un sujeto que lo necesita. Una terapia de combinación de un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1) conduce a mejores resultados terapéuticos (por ejemplo, una tasa de respuesta objetivo y una tasa de control de la enfermedad) en una población de pacientes con tumores malignos positivos a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) que en una población general de pacientes que tienen una mezcla de tumores malignos negativos a LAG-3 y tumores malignos positivos a LAG-3. Para mejorar el tratamiento de los tumores malignos, en un aspecto, la presente invención proporciona la identificación de un paciente que tiene un tumor positivo a LAG-3 y la provisión de una inmunoterapia con un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1).
- 20
- 25 Un método para seleccionar un tumor maligno en un paciente humano para inmunoterapia, comprende: (a) determinar el nivel de la expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) seleccionar el tumor para inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Se proporciona un método para identificar un tumor maligno en un paciente humano como elegible para inmunoterapia, que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) identificar el tumor como elegible para inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Se proporciona un método para identificar un tumor maligno en un paciente humano que probablemente responda a una inmunoterapia, el método que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) identificar el tumor que probablemente responda al tratamiento si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. En una modalidad, la invención incluye un método para identificar un tumor maligno en un paciente humano que probablemente responda a una inmunoterapia, el método que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) identificar el tumor que probablemente responda al tratamiento si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Se proporciona un método para clasificar un tumor maligno en un paciente humano que probablemente responda a una inmunoterapia, el método que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) clasificar el tumor que probablemente responda a la inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende poner en contacto el tumor con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto el tumor con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En ciertas modalidades, cualquiera de los presentes métodos comprende además determinar la expresión de PD-L1 en la muestra del tumor.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- Un método para identificar un paciente con un tumor maligno que probablemente responda a una inmunoterapia de la invención, comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) identificar al paciente que probablemente responda al tratamiento si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. Se desvela un método para seleccionar un paciente con un tumor maligno para inmunoterapia, el método que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor; y (b) seleccionar al paciente para inmunoterapia si el tumor es un tumor positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende poner en contacto el tumor con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto el tumor con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En ciertas modalidades, cualquiera de los presentes métodos comprende además determinar la expresión de PD-L1 en la muestra del tumor.

- 65 En una modalidad, la invención incluye un inhibidor o un anticuerpo para su uso en un método para tratar un tumor maligno en un paciente humano como se define en las reivindicaciones y que comprende: administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí; en donde se predice que el paciente responderá al tratamiento con el inhibidor de LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 basado en la expresión de LAG-3 o en la expresión de LAG-3 y de PD-L1 en una muestra del tumor del paciente. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el

inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1.

El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en un método para tratar un tumor maligno en un paciente humano que lo necesita, que comprende: (a) determinar el nivel de expresión de LAG-3 o el

5 nivel de expresión de LAG-3 y de PD-L1 en una muestra del tumor; y (b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1 si el tumor es un tumor positivo a LAG-3 o un tumor positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en un método para tratar un tumor maligno en un paciente humano que lo necesita, que comprende: (a) identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3; y (b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en incluye un método para tratar un tumor maligno en un paciente humano que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el tumor positivo a LAG-3 es un tumor negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1- En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1.

20 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse en un método para tratar un tumor maligno en un paciente humano que lo necesita, que comprende administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1.

25 30 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para extender un período de supervivencia libre de progresión durante más de 12 meses en un paciente humano afectado por un tumor maligno que comprende administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde el paciente demuestra una supervivencia libre de progresión durante más de 12 meses. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la supervivencia libre de progresión del paciente se puede extender, después de la administración, durante aproximadamente 13 meses, aproximadamente 14 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 16 meses, aproximadamente 17 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, o aproximadamente 10 años. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1.

35 40 45 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para reducir el tamaño de un tumor al menos en 10 % en un paciente humano afectado por un tumor maligno que comprende administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la administración reduce el tamaño del tumor al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o 100 % comparado con el tamaño del tumor antes de la administración. En algunas modalidades, el método comprende identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1.

50 55 60 65 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para prevenir una recaída y/o inducir una remisión en un paciente que comprende administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí, en donde se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el método de la invención comprende (i) identificar un paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno

- positivo a PD-L1, positivo a LAG-3; (ii) administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1.
- 5 El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para aumentar una tasa de respuesta objetivo que va a ser mayor que 55 % en una población de pacientes, en donde cada paciente de la población de pacientes está afectado por un tumor maligno, en un tratamiento contra el cáncer que comprende administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí, en donde se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la tasa de respuesta objetiva es mayor que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, o 75 %. En algunas modalidades, el método comprende identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un anticuerpo de anti-PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1.
- 10 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención puede usarse además en un método para aumentar una tasa de control de la enfermedad que va a ser mayor que 55 % en una población de pacientes, en donde cada paciente de la población de pacientes está afectado por un tumor maligno, en un tratamiento contra el cáncer que comprende administrar al paciente una inmunoterapia descrita aquí, en donde se identifica cada paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración y en donde la tasa de control de la enfermedad es mayor que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, o 75 %. En algunas modalidades, el método comprende identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3 antes de la administración. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1.
- En otras modalidades, cada paciente en los métodos experimenta (i) una supervivencia libre de progresión extendida durante más de 12 meses, (ii) una reducción del tamaño del tumor de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, o aproximadamente 50 % comparado con el tamaño del tumor antes de la administración, o (iii) ambas. En algunas modalidades, la población de pacientes puede ser de al menos 100 pacientes que tienen un tumor maligno positivo a LAG-3 (por ejemplo, melanoma) o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, la población de pacientes puede ser de al menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 pacientes que tienen un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3.
- Un método para seleccionar un paciente humano adecuado para una terapia de combinación comprende: (a) identificar un paciente que tiene un tumor maligno positivo a LAG-3 o un tumor maligno positivo a PD-L1, positivo a LAG-3; y (b) instruir un proveedor de atención médica para que administre al paciente una inmunoterapia descrita aquí. En algunas modalidades, el tumor maligno positivo a LAG-3 es un tumor maligno negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. El método puede comprender además administrar una inmunoterapia descrita aquí. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1. En algunas modalidades, la administración es para tratar el tumor maligno.
- El inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención. Cuando se administran como una inmunoterapia descrita aquí, pueden tratar el tumor maligno, reducir el tamaño del tumor, prevenir el crecimiento del tumor, eliminar el tumor del paciente, prevenir una recaída de un tumor, inducir una remisión en un paciente, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas modalidades, la administración de una inmunoterapia descrita aquí induce una respuesta completa. En otras modalidades, la administración de la inmunoterapia descrita aquí induce una respuesta parcial. En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-

LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3 y el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1.

5 En algunas modalidades, el tumor positivo a LAG-3 comprende al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o 100 % de las células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden los linfocitos infiltrantes del tumor.

10 En algunas modalidades, la identificación comprende determinar la expresión de LAG-3 en un tumor maligno.

15 En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 se determina por la recepción de los resultados de un ensayo capaz de determinar la expresión de LAG-3.

20 En ciertas modalidades, cualquiera de los presentes métodos comprende además determinar la expresión de PD-L1 en la muestra del tumor.

25 En ciertas modalidades, cualquiera de los presentes métodos comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1 antes de la administración. En ciertas modalidades, cualquiera de los presentes métodos comprende además identificar al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1 antes de la administración.

30 En ciertas modalidades, cualquiera de los presentes métodos comprende además determinar la expresión de PD-L1 en el tumor maligno.

35 En ciertas modalidades de cualquiera de los presentes métodos, se identifica al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1 antes de la administración. En ciertas modalidades de cualquiera de los presentes métodos, se identifica al paciente que tiene un tumor maligno negativo a PD-L1 antes de la administración.

40 El método para determinar la expresión de PD-L1 en una muestra del tumor, los métodos para identificar al paciente que tiene un tumor maligno positivo a PD-L1, y los métodos para determinar la expresión de PD-L1 en un tumor maligno han sido descritos en PCT/US2016/029878.

45 En ciertas modalidades, los métodos descritos aquí incluyen métodos para tratar un paciente humano con melanoma no resecable o metastásico que lo necesita con una combinación de un inhibidor de la ruta de PD-1 y un inhibidor de LAG-3, en donde el paciente fue tratado previamente con un inhibidor de anti-PD-1 y/o un inhibidor de anti-PD-L1. En ciertas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En las modalidades particulares, el anticuerpo de anti-PD-1 es el nivolumab. El inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo de anti-LAG-3. En ciertas modalidades, el anticuerpo de LAG-3 es BMS-986016. En las modalidades, el melanoma es un tumor que expresa LAG-3. En las modalidades particulares, el melanoma es un tumor de expresión de LAG-3, con una expresión de LAG-3 $\geq 1\%$.

45 **Medición de la expresión de LAG-3**

50 En ciertas modalidades, la identificación de un paciente adecuado para una terapia de combinación de un inhibidor de LAG-3/inhibidor de la ruta de PD-1 para su uso en los presentes métodos incluye medir o evaluar una expresión de LAG-3 en una muestra, por ejemplo, una muestra del tejido de prueba de un tumor maligno que comprende las células del tumor y las células inflamatorias infiltrantes del tumor. Las frases "tumores que expresan LAG-3", "tumor que expresa LAG-3", "tumor positivo a LAG-3", y "tumor positivo a la expresión de LAG-3" se usan intercambiablemente aquí y abarcan los tumores que comprenden los linfocitos infiltrantes del tumor que expresa LAG-3. El significado de las frases es provisto aquí en otra parte. Los métodos para medir o evaluar la expresión de LAG-3 se pueden lograr por medio de cualquier método aplicable.

55 Para evaluar la expresión de LAG-3, en una modalidad, se obtiene una muestra del tejido de prueba del paciente que necesita la terapia. En algunas modalidades, una muestra del tejido de prueba incluye, pero no está limitada a, cualquier muestra del tejido clínicamente relevante, tal como una biopsia del tumor, una muestra del tejido de la biopsia del núcleo, un aspirado con aguja fina, o una muestra de fluido corporal, tal como la sangre, plasma, suero, linfa, líquido ascítico, líquido quístico, u orina. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es de un tumor primario. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es de una metástasis. En algunas modalidades, se toman muestras del tejido de prueba de un sujeto en múltiples puntos del tiempo, por ejemplo, antes del tratamiento, durante el tratamiento, y/o después del tratamiento. En algunas modalidades, se toman muestras del tejido de prueba de diferentes ubicaciones en el sujeto, por ejemplo, una muestra de un tumor primario y una muestra de una metástasis en una ubicación distante.

- En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido fijada, intercalada en parafina. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido intercalada en parafina fijada en formalina (FFPE, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido fresca (por ejemplo, un tumor). En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido congelada. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido fresca congelada (FF, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, un tumor). En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una célula aislada de un fluido. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba comprende las células circulantes del tumor (CTC, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba comprende los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba comprende las células del tumor y los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba comprende linfocitos circulantes. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido de archivo. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido de archivo con un diagnóstico, tratamiento y/o historial de resultados conocidos. En algunas modalidades, la muestra es un bloque de tejido. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba son células dispersadas. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de aproximadamente 1 célula a aproximadamente 1×10^6 células o más. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de aproximadamente 1 célula a aproximadamente 1×10^5 células. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de aproximadamente 1 célula a aproximadamente 10,000 células. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de aproximadamente 1 célula a aproximadamente 1,000 células. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de aproximadamente 1 célula a aproximadamente 100 células. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de aproximadamente 1 célula a aproximadamente 10 células. En algunas modalidades, el tamaño de la muestra es de una sola célula.
- En otra modalidad, la evaluación de la expresión de LAG-3 se puede lograr sin obtener una muestra del tejido de prueba. En algunas modalidades, la selección de un paciente adecuado incluye (i) proporcionar opcionalmente una muestra del tejido de prueba obtenida de un paciente con cáncer del tejido, la muestra del tejido de prueba que comprende las células del tumor y/o las células inflamatorias infiltrantes del tumor; y (ii) evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 sobre la superficie de las células basado en una evaluación de que la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 sobre la superficie celular es mayor que un nivel de umbral predeterminado.
- Sin embargo, en cualquiera de los métodos que comprenden la medición de la expresión de LAG-3 en una muestra del tejido de prueba, se debe entender que la etapa que comprende la provisión de una muestra del tejido de prueba obtenida de un paciente es una etapa opcional. Es decir, en ciertas modalidades, el método incluye esta etapa, y en otras modalidades, esta etapa no está incluida en el método. También se debe entender que, en ciertas modalidades, la etapa de "medición" o "evaluación" para identificar, o determinar el número o la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 se lleva a cabo por medio de un método de transformación de la evaluación para la expresión de LAG-3, por ejemplo llevando a cabo un ensayo de reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa (RT-PCR) o un ensayo de IHC. En ciertas otras modalidades, no se involucra ninguna etapa de transformación y se evalúa la expresión de LAG-3 revisando, por ejemplo, un informe de resultados de las pruebas de un laboratorio. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 se evalúa revisando los resultados de un ensayo de inmunohistoquímica de un laboratorio. En ciertas modalidades, las etapas de los métodos hasta, y que incluyen, la evaluación de la expresión de LAG-3, proporcionan un resultado intermedio que puede ser provisto a un médico u otro proveedor de atención médica para su uso en la selección de un candidato adecuado para la terapia de combinación de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1. En ciertas modalidades, las etapas de los métodos hasta, y que incluyen, la evaluación de la expresión de LAG-3 proporcionan un resultado intermedio que puede ser provisto a un médico u otro proveedor de atención médica para su uso en la selección de un candidato adecuado para la terapia con un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1). En ciertas modalidades, las etapas de los métodos hasta, y que incluyen, la evaluación de la expresión de LAG-3, proporcionan un resultado intermedio que puede ser provisto a un médico u otro proveedor de atención médica para su uso en la selección de un candidato adecuado para la terapia con un anticuerpo de anti-CTLA-4. En ciertas modalidades, las etapas que proporcionan el resultado intermedio son llevadas a cabo por un especialista médico o alguien que actúa bajo la dirección de un especialista médico. En otras modalidades, estas etapas son llevadas a cabo por un laboratorio independiente o por una persona independiente tal como un técnico de laboratorio.
- En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos presentes, la proporción de las células que expresan LAG-3 se evalúa llevando a cabo un ensayo para detectar la presencia del ARN de LAG-3. En las modalidades adicionales, la presencia del ARN de LAG-3 se detecta por medio de RT-PCR, hibridación *in situ* o protección de RNasa. En algunas modalidades, la presencia del ARN de LAG-3 se detecta por medio de un ensayo basado en RT-PCR. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo basado en RT-PCR comprende evaluar el nivel de expresión de ARN de LAG-3 en la muestra del tejido de prueba en relación con un nivel predeterminado.
- En otras modalidades, la proporción de las células que expresan LAG-3 se evalúa llevando a cabo un ensayo para detectar la presencia del polipéptido de LAG-3. En las modalidades adicionales, la presencia del polipéptido de LAG-3 se detecta por medio de IHC, ensayo de inmunosorción enlazada a la enzima (ELISA), formación de imágenes *in vivo*, o citometría de flujo. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 es ensayada por IHC. En otras modalidades de todos estos métodos, la expresión sobre la superficie celular de LAG-3 se ensaya usando, por ejemplo, IHC o

formación de imágenes *in vivo*.

- En las modalidades, el biomarcador medido es LAG-3, CD4, CD8, FOXP3, CD163 CD68, y cualquier combinación de los mismos. En las modalidades, el biomarcador se mide usando cualquier método de detección descrito aquí. En 5 otras modalidades, la proporción de las células que expresan LAG-3 en la muestra del tejido de prueba se evalúa por medio de la citometría de flujo. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba ensayada por medio de la citometría de flujo comprende las células inmunológicas infiltrantes del tumor. En algunas modalidades, el tumor maligno es una neoplasia maligna hematológica y la muestra del tejido ensayada por medio de la citometría de flujo comprende las células de la sangre periférica. En algunas modalidades, la citometría de flujo es un ensayo multiplex.
- 10 En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende detectar la expresión de los marcadores que comprenden LAG-3, CD4, CD8, FOXP3, y cualquier combinación de los mismos. En algunas modalidades, LAG-3, CD4, CD8, y FOXP3 se detectan como marcadores únicos. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En 15 algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T CD8+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T CD4+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células T FOXP3+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación de la citometría de flujo comprende detectar la expresión de los marcadores que comprenden CD163 y/o CD68. En algunas modalidades, la 20 evaluación de la citometría de flujo comprende evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa CD163 y/o CD68.
- En ciertas modalidades de cualquiera de los presentes métodos, la proporción de las células que expresan LAG-3 en la muestra del tejido de prueba se evalúa llevando a cabo un ensayo para detectar la presencia del polipéptido de 25 LAG-3. En algunas modalidades, la presencia del polipéptido de LAG-3 se detecta por medio de un ensayo de inmunohistoquímica. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una biopsia del tumor. En algunas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra intercalada en parafina fijada en formalina (FFPE).
- 30 En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo monoplex. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo multiplex. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica multiplex es capaz de detectar la presencia de CD4, CD8, FOXP3, CD163, CD68, o cualquier combinación de los mismos.
- 35 En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende poner en contacto la muestra del tumor con el anticuerpo monoclonal de IgG1 de LAG-3 anti-humano de ratón 17B4. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende poner en contacto la muestra del tumor con un anticuerpo de anti-LAG-3 que comprende regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:3 y 5, respectivamente. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende poner en 40 contacto la muestra del tumor con el anticuerpo monoclonal de IgG de LAG-3 anti-humano de conejo SP346. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende poner en contacto la muestra del tumor con el anticuerpo monoclonal de LAG-3 anti-humano 11E3 (Novusbio), 874501 (Novusbio), o EPR4392(2) (Abcam).
- 45 La melanina, por ejemplo, en las muestras del tumor de melanoma, puede interferir con el análisis histológico al oscurecer las características histológicas y al interferir con y/o enmascarar la tinción durante la inmunohistoquímica (IHC). La melanina se puede eliminar blanqueando las muestras. Véase, por ejemplo, Shen y Wu, Appl Immunohistochem Mol Morphol, 23(4): 303-307 (2015); Orchard & Calonje, Am J Dermatopathol, 20(4): 357-61 (1998). En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica comprende blanquear la melanina antes de poner en contacto la muestra con un anticuerpo de anti-LAG-3. Véase, por ejemplo, las figuras 15A-15B. En algunas 50 modalidades, el blanqueo de la melanina comprende poner en contacto la muestra con peróxido de hidrógeno diluido (de 0,1 a 30 % v/v), ácido tricloroisocianúrico (TCCA), permanganato de potasio/ácido oxálico, u otros métodos de oxidación tradicionales para el despigmentado (es decir, la eliminación de la melanina) de las muestras de tejido.
- 55 En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno negro o marrón. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno rojo. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno azul. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno verde. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno púrpura. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica usa un cromógeno amarillo.
- 60 En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa a una baja amplificación. En algunas modalidades, la baja amplificación es de aproximadamente 20X. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa a una alta amplificación. En algunas modalidades, la alta amplificación es de aproximadamente 40X.
- 65 En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa por medio de un software de análisis de imágenes. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa por medio de la evaluación inmunológica visual del patólogo. En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica se evalúa manualmente.

- En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresan LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células inmunológicas en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T CD8+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T CD4+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células T FOXP3+ en la muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3.
- La localización del polipéptido de LAG-3 incluye la localización de la membrana/citoplásica parcial, la localización semejante a puntos, la localización perinuclear, y de la membrana/citoplásica completa. En algunas modalidades, se evalúan las células con la localización de LAG-3 de la membrana/citoplásica parcial. En algunas modalidades, se evalúan las células con la localización de LAG-3 semejante a puntos. En algunas modalidades, se evalúan las células con la localización de LAG-3 de la membrana/citoplásica completa. En algunas modalidades, se evalúan las células con la localización perinuclear de LAG-3. En algunas modalidades, se evalúan las células con cualquier patrón de localización de LAG-3.
- En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo multiplex que comprende además detectar la expresión de MHC clase II por medio de las células del tumor. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células en la muestra del tejido de prueba que expresa MHC clase II. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células no inmunológicas en la muestra del tejido de prueba que expresa MHC clase II. En algunas modalidades, la distribución de las células que expresan MHC II es heterogénea en la muestra del tumor. En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de las células que expresan MHC clase II en las regiones de la muestra del tumor que comprende una alta densidad de células que expresan MHC clase II.
- En algunas modalidades, el ensayo de inmunohistoquímica es un ensayo multiplex que comprende además detectar la expresión de CD163 y/o CD68 por medio de los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL). En algunas modalidades, la evaluación del ensayo de inmunohistoquímica comprende evaluar la proporción de los TIL en la muestra del tejido de prueba que expresa CD163 y/o CD68.
- Las técnicas de formación de imágenes han provisto herramientas importantes en la investigación y el tratamiento del cáncer. Los desarrollos recientes en los sistemas de formación de imágenes moleculares, que incluyen la tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT), formación de imágenes de reflectancia por fluorescencia (FRI), tomografía mediada por fluorescencia (FMT), formación de imágenes bioluminiscentes (BLI), microscopía confocal de escaneo con rayos láser (LSCM) y microscopía de multifotón (MPM), probablemente anunciarán un uso incluso mayor de estas técnicas en la investigación del cáncer. Algunos de estos sistemas de formación de imágenes moleculares permiten a los médicos no solo observar en donde se encuentra un tumor en el cuerpo, sino también visualizar la expresión y la actividad de las moléculas, células y procesos biológicos específicos que influyen en el comportamiento del tumor y/o en la reactividad de los medicamentos terapéuticos (Condeelis y Weissleder, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(12):a003848 (2010)). La especificidad de los anticuerpos, junto con la sensibilidad y la resolución de PET, hace que la formación de imágenes de inmunoPET sea particularmente atractiva para verificar y ensayar la expresión de los antígenos en las muestras del tejido (McCabe y Wu, *Cancer Biother. Radiopharm.* 25(3):253-61 (2010); Olafsen *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 23(4):243-9 (2010)). En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos presentes, la expresión de LAG-3 se ensaya por medio de la formación de imágenes de inmunoPET. En ciertas modalidades, la inmunoPET se lleva a cabo usando un anticuerpo de anti-LAG-3 radioetiquetado con zirconio 89. En ciertas modalidades de cualquiera de los presentes métodos, la proporción de las células en una muestra del tejido de prueba que expresa LAG-3 se evalúa llevando a cabo un ensayo para determinar la presencia del polipéptido de LAG-3 sobre la superficie de las células en la muestra del tejido de prueba. En ciertas modalidades, la muestra del tejido de prueba es una muestra del tejido de FFPE. En otras modalidades, la presencia del polipéptido de LAG-3 se determina por medio del ensayo de IHC. En las modalidades adicionales, el ensayo de IHC se lleva a cabo usando un proceso automatizado. En algunas modalidades, el ensayo de IHC se lleva a cabo usando un mAb de anti-LAG-3 para unirse al polipéptido de LAG-3.

Ensayo de la expresión de LAG-3 por medio de IHC automatizada

- En una modalidad de los presentes métodos, se usa un método de IHC automatizado para ensayar la expresión de LAG-3 en las muestras del tejido de FFPE. Esta descripción proporciona métodos para detectar la presencia de un antígeno de LAG-3 humano en una muestra del tejido de prueba, o para cuantificar el nivel del antígeno de LAG-3 humano o la proporción de las células en la muestra que expresa el antígeno, tales métodos comprenden poner en contacto la muestra de prueba, y una muestra de control negativo, con un mAb que se une específicamente al LAG-3 humano, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y el LAG-

3 humano. En ciertas modalidades, las muestras del tejido de prueba y de control son muestras de FFPE. Luego se detecta la formación de un complejo, en donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra de prueba y la muestra de control negativo es indicativa de la presencia de un antígeno de LAG-3 humano en la muestra. Se usan varios métodos para cuantificar la expresión de LAG-3.

5 En una modalidad particular, el método de IHC automatizado comprende: (a) desparafinar y rehidratar las secciones del tejido montadas en un aparato de tinción automático; (b) recuperar el antígeno en un aparato de tinción automático; (c) preparar los reactivos sobre un aparato de tinción automático; y (d) poner a funcionar el aparato de tinción automático para incluir las etapas de neutralización de la peroxidasa endógena en la muestra del tejido; bloquear los 10 sitios de unión a la proteína no específicos sobre los portaobjetos; incubar los portaobjetos con el Ab primario; incubar con un agente de bloqueo post-primario; incubar con un agente de detección de anticuerpos post-primario, tal como otro anticuerpo que puede o no ser conjugado con una enzima de detección; incubar con un reactivo de detección de la enzima polimérica; agregar un sustrato de cromógeno y hacer el revelado; y contrateñir con hematoxilina. En algunas 15 modalidades, el antígeno de recuperación comprende el uso de cualquier dispositivo de recuperación del antígeno basado en calor.

En algunas modalidades, para evaluar la expresión de LAG-3 en las muestras del tejido del tumor, un patólogo examina el número de células del tumor de LAG-3+ en cada campo bajo un microscopio y estima mentalmente el porcentaje de las células que son positivas, luego los promedia para llegar al porcentaje final. Las diferentes intensidades de 20 tinción se definen como 0/negativo, 1+/débil, 2+/moderado, y 3+/fuerte. Típicamente, los valores porcentuales se asignan primero a las celdas 0 y 3+, y luego se consideran las intensidades 1+ y 2+ intermedias. Para tejidos altamente heterogéneos, la muestra se divide en zonas, y cada zona se evalúa por separado y luego se combinan en un solo conjunto de valores porcentuales. Los porcentajes de las células negativas y positivas para las diferentes intensidades 25 de tinción se determinan a partir de cada área y se proporciona un valor promedio a cada zona. Se proporciona un valor porcentual final al tejido para cada categoría de intensidad de tinción: negativo, 1+, 2+, y 3+. La suma de todas las intensidades de tinción va a ser del 100 %.

En algunas modalidades, la tinción también se evalúa en las células inflamatorias infiltrantes del tumor tales como los 30 macrófagos y los linfocitos. Los macrófagos y los linfocitos se evalúan para la tinción de LAG-3 y solamente se registran para todas las muestras que son positivas o negativas para cada categoría de células. La tinción también se caracteriza de acuerdo una designación de las células inmunológicas del tumor externas/internas. "Interna" significa que la célula inmunológica está dentro del tejido del tumor y/o sobre los límites de la región del tumor sin estar físicamente intercalada entre las células del tumor. "Externa" significa que no existe una asociación física con el tumor, las células inmunológicas se encuentran en la periferia asociada con el tejido conectivo o cualquier tejido adyacente asociado.

35 En ciertas modalidades de estos métodos de evaluación, las muestras son evaluadas por dos o más patólogos que operan independientemente, y las evaluaciones son consolidadas subsiguientemente. En ciertas otras modalidades, la identificación de las células positivas y negativas se evalúa usando el software apropiado.

40 Un índice histoscore (evaluación H) se usa como una medida más cuantitativa de los datos de IHC. El índice histoscore se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Índice histoscore} = [(\% \text{ del tumor} \times 1 \text{ (baja intensidad)}) + (\% \text{ del tumor} \times 2 \text{ (intensidad intermedia)}) + (\% \text{ del tumor} \times 3 \text{ (alta intensidad)})]$$

45 Para determinar el índice histoscore, el patólogo estima el porcentaje de las células teñidas en cada categoría de intensidad dentro de una muestra. Debido a que la expresión de la mayoría de los biomarcadores es heterogénea, el índice histoscore es una representación más verdadera de la expresión general. El intervalo del índice histoscore final es de 0 (evaluación mínima, sin expresión) a 300 (evaluación máxima, expresión fuerte e inclusiva).

50 3. Inhibidores de LAG-3

En un aspecto, el inhibidor o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención presenta un agente de unión a LAG-3 que es un anticuerpo que se une específicamente a LAG-3.

55 El inhibidor de LAG-3 descrito aquí es un agente de unión a LAG-3, que es un anticuerpo de anti-LAG-3.

60 Los anticuerpos de LAG-3 anti-humanos (o los dominios de VH/VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención se pueden generar usando los métodos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, se pueden usar anticuerpos de anti-LAG-3 reconocidos en la técnica. En ciertas modalidades, los inhibidores de LAG-3 incluyen un anticuerpo biespecífico de anti-LAG-3. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 se une a LAG-3 y a PD-1.

65 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-LAG-3 es BMS-986016 que comprende cadenas ligeras y pesadas que comprenden las secuencias mostradas en las SEC ID NO:1 y 2, respectivamente, o fragmentos de unión al antígeno y variantes de los mismos, como se describe en PCT/US13/48999.

En otras modalidades, el anticuerpo tiene las CDR de cadena ligera y pesada o las regiones variables de BMS-986016. De acuerdo con esto, en una modalidad, el anticuerpo comprende los dominios de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región de VH de BMS-986016 que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:3, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región de VL de BMS-986016 que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:5. En otra modalidad, el anticuerpo comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO: 7, 8, y 9, respectivamente, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO: 10, 11, y 12, respectivamente. En otra modalidad, el anticuerpo comprende las regiones de VH y/o de VL que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEC ID NO:3 y/o la SEC ID NO:5, respectivamente. En otra modalidad, el anticuerpo comprende las regiones variable de cadena ligera (VL) y/o variable de cadena pesada (VH) codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos establecidas en la SEC ID NO:4 y/o la SEC ID NO:6, respectivamente. En otra modalidad, el anticuerpo compite por unirse con y/o unirse al mismo epítopo en LAG-3 como los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra modalidad, el anticuerpo se une a un epítopo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEC ID NO:14). En otra modalidad, el anticuerpo se une a un epítopo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos HPAAPSSW (SEC ID NO:15) o PAAPSSWG (SEC ID NO:16).

En otra modalidad, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente 90 % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente 90 %, 95 % o 99 % de identidad de la región variable con la SEC ID NO:3 o la SEC ID NO:5).

En algunas modalidades, los anticuerpos de anti-LAG-3 reconocidos en la técnica se pueden usar en los métodos terapéuticos de la invención. Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo de anti-LAG-3 humano descrito en US2011/0150892 A1, y referido como anticuerpo monoclonal 25F7 (también conocido como "25F7" y "LAG-3.1"). Otros anticuerpos de anti-LAG-3 reconocidos en la técnica que se puede usar incluyen IMP731 (H5L7BW) descrito en US 2011/007023, MK-4280 (28G-10) descrito en WO2016028672, REGN3767 descrito en Journal for ImmunoTherapy of Cancer, (2016) Vol. 4, Supp. suplemento 1 resumen número: P195, BAP050 descrito en WO2017/019894, IMP-701 (LAG-525), Sym022, TSR-033, MGD013, B1754111, FS118, AVA-017 y GSK2831781. Estos y otros anticuerpos de anti-LAG-3 útiles en la invención reivindicada se pueden encontrar en, por ejemplo: WO2016/028672, WO2017/106129, WO2017/062888, WO2009/044273, WO2018/069500, WO2016/126858, WO2014/179664, WO2016/200782, WO2015/200119, WO2017/019846, WO2017/198741, WO2017/220555, WO2017/220569, WO2018/071500, WO2017/015560, WO2017/025498, WO2017/087589, WO2017/087901, WO2018/083087, WO2017/149143, WO2017/219995, US2017/0260271, WO2017/086367, WO2017/086419, WO2018/034227, y WO2014/140180.

También se pueden usar anticuerpos que compiten con cualquiera de los anticuerpos reconocidos en la técnica mencionados anteriormente para unirse a LAG-3.

En ciertas modalidades, se usa un anticuerpo de anti-LAG-3 para determinar la expresión de LAG-3. En algunas modalidades, un anticuerpo de anti-LAG-3 se selecciona por su capacidad para unirse a LAG-3 en muestras del tejido intercaladas en parafina, fijadas en formalina (FFPE). En otras modalidades, un anticuerpo de anti-LAG-3 es capaz de unirse a LAG-3 en tejidos congelados. En las modalidades adicionales, un anticuerpo de anti-LAG-3 es capaz de distinguir formas unidas a la membrana, citoplásMICAS y/o solubles de LAG-3.

En algunas modalidades, un anticuerpo de anti-LAG-3 útil para ensayar, detectar, y/o cuantificar la expresión de LAG-3 de acuerdo con los métodos descritos aquí es el anticuerpo monoclonal de LAG-3 anti-humano de IgG1 de ratón 17B4, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Véase, por ejemplo, J. Matsuzaki, *et al.*; PNAS 107, 7875 (2010).

50 4. Inhibidores de la ruta de PD-1

Como se usa aquí, "inhibidor de la ruta de PD-1" incluye agentes de unión a PD-1, agentes de unión a PD-L1 y agentes de unión a PD-L2. Los agentes de unión a PD-1 son anticuerpos que se unen específicamente a PD-1. Los agentes de unión a PD-L1 y PD-L2 son anticuerpos que se unen específicamente a PD-L1 y/o PD-L2.

En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-1. En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo de anti-PD-L2.

Los anticuerpos de PD-1 anti-humanos (o los dominios de VH y/o de VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención se pueden generar usando los métodos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, se pueden usar los anticuerpos de anti-PD-1 reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos monoclonales 5C4 (referidos aquí como Nivolumab o BMS-936558), 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3, y 5F4, descritos en WO 2006/121168. Otros anticuerpos de PD-1 conocidos incluyen el lambrolizumab (MK-3475) descrito en WO 2008/156712, y AMP-514 descrito en WO 2012/145493. Otros anticuerpos de PD-1 conocidos y otros inhibidores de PD-1 incluyen aquellos descritos en, por ejemplo, WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335 y WO

2011/161699. En una modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 es REGN2810. En una modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 es PDR001. Otro anticuerpo de anti-PD-1 conocido es el pidilizumab (CT-011).

5 En una modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 es el nivolumab. El nivolumab (también conocido como "OPDIVO®"; anteriormente designado como 5C4, BMS-936558, MDX-1106, u ONO-4538) es un anticuerpo inhibidor del punto de control inmunológico de PD-1 de IgG4 (S228P) completamente humano que previene selectivamente la interacción con los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2), bloqueando así la regulación negativa de las funciones de las células T antitumorales (patente U.S. número 8,008,449; Wang *et al.*, Cancer Immunol Res. 2(9):846-56 (2014)). En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo compite de manera cruzada con el nivolumab. En 10 otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo se une al mismo epítopo que nivolumab. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 tiene las mismas CDR que nivolumab.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 comprende cadenas ligeras y pesadas que comprenden las secuencias mostradas en las SEC ID NO:17 y 18, respectivamente, o fragmentos de unión al antígeno y variantes del mismo.

20 En otras modalidades, el anticuerpo tiene las CDR de cadena ligera y pesada o las regiones variables de nivolumab. De acuerdo con esto, en una modalidad, el anticuerpo comprende los dominios de CDR1, CDR2, y CDR3 de la VH de nivolumab que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:19, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL de nivolumab que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:21. En otra modalidad, el anticuerpo comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:23, 24, y 25, respectivamente, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:26, 27 y 28, respectivamente. En otra modalidad, el anticuerpo comprende regiones de VH y/o de VL que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEC ID NO:19 y/o la SEC ID NO:21, respectivamente. 25 En otra modalidad, el anticuerpo comprende las regiones variable de cadena ligera (VL) y/o variable de cadena pesada (VH) codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos establecidas en la SEC ID NO:20 y/o la SEC ID NO:22, respectivamente. En otra modalidad, el anticuerpo compite por unirse con, y/o unirse al, mismo epítopo en PD-1 como los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra modalidad, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente 90 % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente 30 (por ejemplo, al menos aproximadamente 90 %, 95 % o 99 % de identidad de la región variable con la SEC ID NO:19 o la SEC ID NO:21).

35 Los anticuerpos monoclonales humanos (HuMAb) que se unen específicamente a PD-1 con alta afinidad han sido descritos en las patentes U.S. números 8.008.449 y 8.779.105. Se han descrito otros mAb de anti-PD-1, por ejemplo, en las patentes U.S. números 6.808.710, 7.488.802, 8.168.757 y 8.354.509, y la publicación del PCT número WO 2012/145493. En algunas modalidades, se ha demostrado que el anticuerpo de anti-PD-1 exhibe una o más de las siguientes características: (a) se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, como se determina por medio de la resonancia del plasmón superficial usando un sistema biosensor de Biacore; (b) no se une sustancialmente a CD28 humanas, CTLA-4 o ICOS; (c) aumenta la proliferación de las células T en un ensayo de la reacción de linfocitos mezclados (MLR); (d) aumenta la producción del interferón γ en un ensayo de MLR; (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de MLR; (f) se une a PD-1 humana y a PD-1 del mono cinomolgo; (g) inhibe la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1; (h) estimula las respuestas de memoria específicas para el antígeno; (i) estimula las respuestas de los anticuerpos; y (j) inhibe el crecimiento de las células del tumor *in vivo*. Los anticuerpos de anti-PD-1 útiles para la 40 presente invención incluyen los mAb que se unen específicamente a PD-1 humana y exhiben al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco de las características anteriores. Los anticuerpos de anti-PD-1 que exhiben una o más de estas características han sido descritos en las patentes U.S. números 8.008.449, 8.779.105, 6.808.710, 7.488.802, 8.168.757 y 8.354.509, y la publicación del PCT número WO 2012/145493. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 es el pembrolizumab. El pembrolizumab es un anticuerpo de IgG4 monoclonal humanizado (S228P) dirigido contra la PD-1 del receptor de la superficie celular humana (muerte programada 1 o muerte celular 45 programada 1). El pembrolizumab se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. números 8.354.509 y 8.900.587.

50 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo compite de manera cruzada con el pembrolizumab. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo se une al mismo epítopo que pembrolizumab. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 tiene las mismas CDR que el pembrolizumab. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 es el pembrolizumab. El pembrolizumab (también conocido como "KEYTRUDA®", lambrolizumab, y MK-3475) es un anticuerpo de IgG4 monoclonal humanizado dirigido contra la PD-1 del receptor de la superficie celular humana (muerte programada 1 o muerte celular programada 1). El pembrolizumab se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. números 8.354.509 y 8.900.587; véase también <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789> (último acceso: el 14 de diciembre del 2014). El pembrolizumab ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma recidivante o refractario.

55 En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo compite de manera cruzada con MEDI0608. Todavía en otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo se une al mismo epítopo que MEDI0608. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 tiene las mismas CDR que MEDI0608. En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es MEDI0608 (anteriormente AMP-514), que es un anticuerpo monoclonal. MEDI0608 se describe, por ejemplo, en la patente U.S. No. 8.609.089B2 o en

<http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=756047> (último acceso el 14 de diciembre del 2014).

En ciertas modalidades, el primer anticuerpo es un antagonista de anti-PD-1. Un ejemplo del antagonista de anti-PD-1 es AMP-224, que es una proteína de fusión de Fc B7-DC. AMP-224 se describe en la publicación U.S. número 2013/0017199 o en <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=700595> (último acceso el 8 de julio del 2015).

En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo compite de manera cruzada con BGB-A317. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento del mismo se une al mismo epítopo que BGB-A317. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 tiene las mismas CDR que BGB-A317. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es BGB-A317, que es un anticuerpo monoclonal humanizado. BGB-A317 se describe en la publicación U.S. número 2015/0079109.

En algunas modalidades, el anticuerpo es el pidilizumab (CT-011), que es un anticuerpo que se informó previamente que se une a PD-1, pero que se cree que se une a un objetivo diferente. El pidilizumab se describe en la patente U.S. número 8.686.119 B2 o WO 2013/014668 A1.

En ciertas modalidades, los anticuerpos que compiten de manera cruzada para unirse a PD-1 humana con, o para unirse a la misma región del epítopo de PD-1 humana que, el nivolumab, son los mAb. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos que compiten de manera cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados o humanos. Tales mAb quiméricos, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar por medio de los métodos bien conocidos en la técnica.

Se han descrito otros anticuerpos monoclonales de anti-PD-1, por ejemplo, en las patentes U.S. números 6.808.710, 7.488.802, 8.168.757 y 8.354.509, la publicación US número 2016/0272708 y las publicaciones del PCT números WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, WO 2017/19846, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825, y WO 2017/133540.

En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de nivolumab (también conocido como OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106, y ONO-4538), pembrolizumab (Merck; también conocido como KEYTRUDA®, lambrolizumab, y MK-3475; véase WO2008/156712), PDR001 (Novartis; véase WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; también conocido como AMP-514; véase WO 2012/145493), cemiplimab (Regeneron; también conocido como REGN-2810; véase WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; véase Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; véase WO 2015/35606 y US 2015/0079109), INCNSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; también conocido como SHR-1210; véase WO 2015/085847; Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), TSR-042 (Tesaro Biopharmaceutical; también conocido como ANB011; véase WO2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; también conocido como WBP3055; véase Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; véase WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; véase WO 2017/040790), MGA012 (Macrogenics, véase WO 2017/19846), e IBI308 (Innovent; véase WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825, y WO 2017/133540).

Los anticuerpos de anti-PD-1 útiles para las composiciones de la invención descrita también incluyen partes de unión al antígeno de los anticuerpos anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo por medio de los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados dentro del término "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento de Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios de V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento de F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos de Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de articulación; (iii) un fragmento de Fd que consiste de los dominios de V_H y de C_{H1}; y (iv) un fragmento de Fv que consiste de los dominios de V_L y de V_H de una sola ramificación de un anticuerpo.

Los anticuerpos de anti-PD-1 que se pueden usar en los métodos descritos también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a PD-1 humana y que compiten de manera cruzada para la unión a PD-1 humana con cualquier anticuerpo de anti-PD-1 descrito aquí, por ejemplo, nivolumab (véase, por ejemplo, la patente U.S. número 8,008,449 y 8,779,105; WO 2013/173223). En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 se une al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos de anti-PD-1 descritos aquí, por ejemplo, nivolumab. La capacidad de los anticuerpos para competir de manera cruzada para la unión a un antígeno indica que estos anticuerpos monoclonales se unen a la misma región del epítopo del antígeno e impiden estéricamente la unión de otros anticuerpos que compiten de manera cruzada a esta región del epítopo particular. Se espera que estos anticuerpos que compiten de manera cruzada tengan propiedades funcionales muy semejantes a aquellas del anticuerpo de referencia, por ejemplo, nivolumab, en virtud de su unión a la misma región del epítopo de PD-1. Los anticuerpos que compiten de manera cruzada se pueden identificar fácilmente con base en su capacidad de competir de manera cruzada con el nivolumab en los ensayos de unión a PD-1 estándares, tales como el análisis de Biacore, ensayos de ELISA o citometría de flujo

(véase, por ejemplo, WO 2013/173223).

- 5 Los anticuerpos de anti-PD-1 adecuados para su uso en los métodos descritos son anticuerpos que se unen a PD-1 con alta especificidad y afinidad, que bloquean la unión de PD-L1 y/o PD-L2, y que inhiben el efecto inmunosupresor de la ruta de señalización de PD-1. En cualquiera de las composiciones o métodos descritos aquí, un "anticuerpo" de anti-PD-1 incluye una parte o fragmento de unión al antígeno que se une al receptor de PD-1 y que exhibe propiedades funcionales semejantes a aquellas de los anticuerpos completos en la inhibición de la unión del ligando y en la regulación positiva del sistema inmunológico. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o la parte de unión al antígeno del mismo compiten de manera cruzada con el nivolumab para unirse a PD-1 humana. En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o la parte de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal químérico, humanizado o humano o una parte del mismo. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se pueden usar los anticuerpos de un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 10 15 En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o la parte de unión al antígeno del mismo comprenden una región constante de cadena pesada que es de un isotipo de IgG1 o IgG4 humano. En ciertas otras modalidades, la secuencia de la región constante de la cadena pesada de IgG4 del anticuerpo de anti-PD-1 o la parte de unión al antígeno del mismo contiene una mutación S228P que reemplaza un residuo de serina en la región de articulación con el residuo de prolina que normalmente se encuentra en la posición correspondiente en los anticuerpos del isotipo de IgG1. Esta 20 mutación, que está presente en el nivolumab, previene el intercambio de la ramificación de Fab con los anticuerpos de IgG4 endógenos, mientras que conserva la baja afinidad para la activación de los receptores de Fc asociados con los anticuerpos de IgG4 de tipo silvestre (Wang *et al.*, 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56). Todavía en otras modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera que es una región constante kappa o lambda humana. En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 o la parte de unión al antígeno del mismo es un 25 mAb o una parte de unión al antígeno del mismo. En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos terapéuticos descritos aquí que comprenden la administración de un anticuerpo de anti-PD-1, el anticuerpo de anti-PD-1 es el nivolumab. En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es el pembrolizumab. En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 se selecciona de los anticuerpos humanos 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4 descritos en la patente U.S. número 8.008.449. Todavía en otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es MEDI0608 (anteriormente AMP-30 514), AMP-224, o BGB-A317.

En las modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es un anticuerpo biespecífico. En las modalidades, el anticuerpo de anti-PD-1 es un anticuerpo biespecífico que se une tanto a PD-1 como a LAG-3.

35 5. Anticuerpos de anti-PD-L1

- 40 En ciertas modalidades, la presente solicitud abarca el uso de un anticuerpo de anti-PD-L1 como el inhibidor de la ruta de PD-1. En una modalidad, el anticuerpo de anti-PD-L1 inhibe la unión del receptor de PD-L1, es decir, de PD-1 a su ligando de PD-L1.
- 45 Los anticuerpos de anti-PD-L1 humanos (o los dominios de VH y/o de VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención se pueden generar usando los métodos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, se pueden usar anticuerpos de anti-PD-L1 reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos de anti-PD-L1 humanos descritos en la patente U.S. número 7.943.743. Tales anticuerpos de anti-PD-L1 incluyen 3G10, 12A4 (también referido como BMS-936559), 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, y 13G4. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 es el atezolizumab (Tecentriq o RG7446) (véase, por ejemplo, Herbst *et al.* (2013) *J Clin Oncol* 31(suppl):3000. Resumen; la patente U.S. número 8.217.149), durvalumab (Imfinzi o MEDI4736) (Khleif (2013) en: *Proceedings from the European Cancer Congress 2013*; 27 de septiembre-1 de octubre de 2013; Amsterdam, Países Bajos. resumen 802), avelumab (Bavencio). Otros anticuerpos de anti-PD-L1 reconocidos en la técnica que se pueden usar incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en las patentes U.S. números 7.635.757 y 8.217.149, la publicación U.S. número 2009/0317368, y las publicaciones del PCT números WO 2011/066389 y WO 2012/145493. También se pueden usar los anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos o inhibidores reconocidos en la técnica para la unión a PD-L1. Los ejemplos de los anticuerpos de anti-PD-L1 útiles en los métodos de la presente descripción incluyen los anticuerpos descritos en la patente U.S. número 9.580.507. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales humanos de anti-PD-L1 descritos en la patente U.S. número 9.580.507 exhiben una o más de las siguientes características: (a) se unen a PD-L1 humano con una KD de 1×10^{-7} M o menos, como se determina por medio de la resonancia del plasmón superficial usando un sistema biosensor de Biacore; (b) aumentan la proliferación de las células T en un ensayo de la reacción de linfocitos mezclados (MLR); (c) aumentan la producción del interferón γ en un ensayo de MLR; (d) aumentan la secreción de IL-2 en un ensayo de MLR; (e) estimulan las 55 60 respuestas de los anticuerpos; y (f) revierten el efecto de las células reguladoras T sobre las células efectoras de las células T y/o las células dendríticas. Los anticuerpos de anti-PD-L1 que se pueden usar en la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PD-L1 humano y que exhiben al menos una, en algunas modalidades, al menos cinco, de las características anteriores.
- 65 En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 es BMS-936559 (anteriormente 12A4 o MDX-1105) (véase, por ejemplo, la patente U.S. número 7.943.743; WO 2013/173223). En otras modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 es

- MPDL3280A (también conocido como RG7446 y atezolizumab) (véase, por ejemplo, Herbst *et al.* 2013 *J Clin Oncol* 31(suppl):3000; la patente U.S. número 8,217,149), MEDI4736 (Khleif, 2013, en: *Proceedings from the European Cancer Congress 2013; 27 de septiembre-1 de octubre de 2013; Amsterdam, Países Bajos. resumen 802*), o MSB0010718C (también llamado Avelumab; véase US 2014/0341917). En ciertas modalidades, los anticuerpos que compiten de manera cruzada para la unión a PD-L1 humano con, o que se unen a la misma región del epítopo de PD-L1 humano que los anticuerpos de PD-L1 de las referencias anteriores son los mAb. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos que compiten de manera cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos, o pueden ser anticuerpos humanizados o humanos. Tales mAb quiméricos, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar por medio de los métodos bien conocidos en la técnica. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste de BMS-936559 (también conocido como 12A4, MDX-1105; véase, por ejemplo, la patente U.S. número 7,943,743 y WO 2013/173223), atezolizumab (Roche; también conocido como TECENTRIQ®; MPDL3280A, RG7446; véase US 8,217,149; véase, también, Herbst *et al.* (2013) *J Clin Oncol* 31(suppl):3000), durvalumab (AstraZeneca; también conocido como IMFINZI™, MEDI-4736; véase WO 2011/066389), avelumab (Pfizer; también conocido como BAVENCIO®, MSB-0010718C; véase WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; véase WO2013/181634), CX-072 (Cytomx; véase WO2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; véase Zhang *et al.*, *Cell Discov.* 7:3 (marzo de 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; véase, por ejemplo, WO 2017/034916), y CK-301 (Checkpoint Therapeutics; véase Gorelik *et al.*, AACR: resumen 4606 (abril de 2016)).
- En ciertas modalidades, el anticuerpo de PD-L1 es el atezolizumab (TECENTRIQ®). El atezolizumab es un anticuerpo de anti-PD-L1 monoclonal de IgG1 completamente humanizado.
- En ciertas modalidades, el anticuerpo de PD-L1 es el durvalumab (IMFINZI™). El durvalumab es un anticuerpo de anti-PD-L1 monoclonal kappa de IgG1 humano.
- En ciertas modalidades, el anticuerpo de PD-L1 es el avelumab (BAVENCIO®). El avelumab es un anticuerpo de anti-PD-L1 monoclonal lambda de IgG1 humano.
- En otras modalidades, el anticuerpo monoclonal de anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste de 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1, y cualquier combinación de los mismos.
- Los anticuerpos de anti-PD-L1 que se pueden usar en los métodos descritos también incluyen los anticuerpos aislados que se unen específicamente a PD-L1 humano y que compiten de manera cruzada para la unión a PD-L1 humano con cualquier anticuerpo de anti-PD-L1 descrito aquí, por ejemplo, el atezolizumab, durvalumab, y/o avelumab. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 se une al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos de anti-PD-L1 descritos aquí, por ejemplo, el atezolizumab, durvalumab, y/o avelumab. La capacidad de los anticuerpos para competir de manera cruzada para la unión a un antígeno indica que estos anticuerpos se unen a la misma región del epítopo del antígeno e impiden estéricamente la unión de otros anticuerpos que compiten de manera cruzada en esta región del epítopo particular. Se espera que éstos, los anticuerpos que compiten de manera cruzada tengan propiedades funcionales muy semejantes a aquellas del anticuerpo de referencia, por ejemplo, el atezolizumab y/o avelumab, en virtud de su unión a la misma región del epítopo de PD-L1. Los anticuerpos que compiten de manera cruzada se pueden identificar fácilmente con base en su capacidad para competir de manera cruzada con el atezolizumab y/o avelumab en los ensayos de unión a PD-L1 estándares, tales como el análisis de Biacore, ensayos de ELISA o citometría de flujo (véase, por ejemplo, WO 2013/173223).
- En ciertas modalidades, los anticuerpos que compiten de manera cruzada para la unión a PD-L1 humano con, o que se unen a, la misma región del epítopo del anticuerpo de PD-L1 humano que, el atezolizumab, durvalumab, y/o avelumab, son anticuerpos monoclonales. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos que compiten de manera cruzada son anticuerpos quiméricos, anticuerpos modificados genéticamente, o anticuerpos humanizados o humanos. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos, modificados genéticamente, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar por medio de los métodos bien conocidos en la técnica.
- Los anticuerpos de anti-PD-L1 que se pueden usar en los métodos de la invención descrita también incluyen partes de unión al antígeno de los anticuerpos anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo por medio de los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa.
- Los anticuerpos de anti-PD-L1 adecuados para su uso en los métodos o composiciones descritas son los anticuerpos que se unen a PD-L1 con alta especificidad y afinidad, que bloquean la unión de PD-1, y que inhiben el efecto inmunosupresor de la ruta de señalización de PD-1. En cualquiera de las composiciones o métodos descritos aquí, un "anticuerpo" de anti-PD-L1 incluye una parte o fragmento de unión al antígeno que se une a PD-L1 y que exhibe propiedades funcionales semejantes a aquellas de los anticuerpos completos en la inhibición de la unión del receptor y en la regulación positiva del sistema inmunológico. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-PD-L1 o la parte de unión al antígeno del mismo compiten de manera cruzada con el atezolizumab, durvalumab, y/o avelumab para la unión a PD-L1 humano.
- Los anticuerpos de anti-PD-L1 útiles para la invención incluyen anticuerpos modificados genéticamente a partir de los anticuerpos que tienen una o más de las secuencias de V_H y/o de V_L descritas aquí, cuyos anticuerpos modificados

genéticamente pueden tener propiedades alteradas de los anticuerpos de partida. Un anticuerpo de anti-PD-L1 se puede modificar genéticamente por medio de una variedad de modificaciones como se describió anteriormente para la modificación genética de los anticuerpos de anti-PD-1 modificados de la invención.

5 **6. Anticuerpos de anti-CTLA-4**

Un anticuerpo de anti-CTLA-4 se une a e inhibe CTLA-4. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-CTLA-4 es el ipilimumab (YERVOY), tremelimumab (ticilimumab; CP-675,206), AGEN-1884, o ATOR-1015.

10 **7. Inhibidores del punto de control inmunológico**

Un inhibidor de PD-1 puede usarse en combinación con un inhibidor del punto de control inmunológico en el tratamiento de tumores malignos. Se puede usar cualquier inhibidor del punto de control inmunológico reconocido en la técnica.

15 En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CTLA-4, un antagonista de CD80, un antagonista de CD86, un antagonista de Tim-3, un antagonista de TIGIT, un antagonista de CD20, un antagonista de CD96, un antagonista de IDO1, un antagonista de STING, un antagonista de GARP, un antagonista de CD40, un antagonista de A2aR, un antagonista de CEACAM1 (CD66a), un antagonista de CEA, un antagonista de CD47, un antagonista de PVRIG, un antagonista de TDO, un antagonista de VISTA, o un antagonista de KIR.

20 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CTLA-4. En ciertas modalidades, el antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo de anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-CTLA-4 es el ipilimumab (YERVOY), tremelimumab (ticilimumab; CP-675,206), AGEN-1884, o ATOR-1015.

25 En una modalidad, el antagonista de CTLA-4 es un polipéptido de CTLA-4 soluble. En una modalidad, el polipéptido de CTLA-4 soluble es abatacept (Orencia), belatacept (Nulojix), RG2077, o RG-1046. En otra modalidad, el antagonista de CTLA-4 es una terapia basada en las células. En algunas modalidades, el antagonista de CTLA-4 es una vacuna de células dendríticas autólogas transfectadas con ARN del ARN/GITRL del mAb de anti-CTLA-4 o una vacuna de células dendríticas autólogas transfectadas con ARN de anti-CTLA-4.

30 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de KIR. En ciertas modalidades, el antagonista de KIR es un anticuerpo de anti-KIR o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-KIR es el lirilumab (1-7F9, BMS-986015, IPH 2101) o IPH4102.

35 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de TIGIT. En una modalidad, el antagonista de TIGIT es un anticuerpo de anti-TIGIT o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-TIGIT es BMS-986207, AB 154, COM902 (CGEN-15137), o OMP-313M32.

40 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es el antagonista de Tim-3. En ciertas modalidades, el antagonista de Tim-3 es un anticuerpo de anti-Tim-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-Tim-3 es TSR-022 o LY3321367.

45 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de IDO1. En otra modalidad, el antagonista de IDO1 es el indoximod (NLG8189; 1-metil-D-TRP), epacadostat (INCB-024360, INCB-24360), KHK2455, PF-06840003, navoximod (RG6078, GDC-0919, NLG919), BMS-986205 (F001287), o derivados de pirrolidina-2,5-diona.

50 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de STING. En ciertas modalidades, el antagonista de STING es de di-nucleótidos cílicos sustituidos por 2' o 3'-mono-fluoro; de di-nucleótidos cílicos de enlaces 2',5'-3',5' mezclados sustituidos por 2'3'-di-fluoro; de di-nucleótidos bis-3',5' cílicos, sustituidos por 2'-fluoro; di-nucleótidos 2',2"-dif-Rp,Rp,bis-3',5' cílicos; o de di-nucleótidos cílicos fluorados.

55 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es el antagonista de CD20. En algunas modalidades, el antagonista de CD20 es un anticuerpo de anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una modalidad, el anticuerpo de anti-CD20 es el rituximab (RITUXAN; IDEC-102; IDEC-C2B8), ABP 798, ofatumumab, o obinutuzumab.

60 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es el antagonista de CD80. En ciertas modalidades, el antagonista de CD80 es un anticuerpo de anti-CD80 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una modalidad, el anticuerpo de anti-CD80 es el galiximab o AV 1142742.

65 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de GARP. En algunas modalidades, el antagonista de GARP es un anticuerpo de anti-GARP o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-GARP es ARGX-115.

- En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CD40. En ciertas modalidades, el antagonista de CD40 es un anticuerpo de anti-CD40 para el fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-CD40 es BMS3h-56, lucatumumab (HCD122 y CHIR-12.12), CHIR-5.9, o dacetuzumab (huS2C6, PRO 64553, RG 3636, SGN 14, SGN-40). En otra modalidad, el antagonista de CD40 es un ligando de CD40 soluble (CD40-L). En una modalidad, el ligando de CD40 soluble es un polipéptido de fusión. En una modalidad, el ligando de CD40 soluble es un CD40-L/FC2 o un CD40-L monomérico.
- 5 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de A2aR. En algunas modalidades, el antagonista de A2aR es una molécula pequeña. En ciertas modalidades, el antagonista de A2aR es CPI-444, PBF-10 509, istradefilina (KW-6002), preladenant (SCH420814), tozadenant (SYN115), vepadenant (BIIIB014), HTL-1071, ST1535, SCH412348, SCH442416, SCH58261, ZM241385, o AZD4635.
- 10 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CEACAM1. En algunas modalidades, el antagonista de CEACAM1 es un anticuerpo de anti-CEACAM1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una modalidad, el anticuerpo de anti-CEACAM1 es CM-24 (MK-6018).
- 15 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CEA. En una modalidad, el antagonista de CEA es un anticuerpo de anti-CEA o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-CEA es el cergutuzumab amunaleucina (RG7813, RO-6895882) o RG7802 (RO6958688).
- 20 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de CD47. En algunas modalidades, el antagonista de CD47 es un anticuerpo de anti-CD47 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertas modalidades, el anticuerpo de anti-CD47 es HuF9-G4, CC-90002, TTI-621, ALX148, NI-1701, NI-1801, SRF231, o Effi-DEM.
- 25 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de PVRIG. En ciertas modalidades, el antagonista de PVRIG es un anticuerpo de anti-PVRIG o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En una modalidad, el anticuerpo de anti-PVRIG es COM701 (CGEN-15029).
- 30 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de TDO. En una modalidad, el antagonista de TDO es un derivado de 4-(indol-3-il)-pirazol, un derivado sustituido con 3-indol, o un derivado de 3-(indol-3-il)-piridina. En otra modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de IDO y de TDO doble. En una modalidad, el antagonista de IDO y de TDO doble es una molécula pequeña.
- 35 En una modalidad, el inhibidor del punto de control inmunológico es un antagonista de VISTA. En algunas modalidades, el antagonista de VISTA es CA-170 o JNJ-61610588.
- 8. Composiciones farmacéuticas**
- 40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a pacientes humanos se formulan típicamente para la administración parenteral, por ejemplo, en un portador líquido, o son adecuadas para la reconstitución en una solución o suspensión líquida para la administración intravenosa.
- 45 En general, tales composiciones comprenden típicamente un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno o que está incluido en la farmacopea de EUA u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen del petróleo, de un animal, vegetal o sintético, tales como el aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, ricinoleato de polietilenglicol y glicerol, y semejantes. El agua o la solución salina acuosa y las soluciones de glicerol y dextrosa acuosas se pueden emplear como portadores, particularmente para soluciones inyectables (por ejemplo, que comprenden un anticuerpo de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1). Las composiciones líquidas para la administración parenteral se pueden formular para la administración por medio de una inyección o infusión continua. Las rutas de administración por medio de una inyección o infusión incluyen la intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal y subcutánea. En una modalidad, los anticuerpos de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 se administran por ruta intravenosa (por ejemplo, en formulaciones separadas o juntas (en la misma formulación o en formulaciones separadas)).
- 55
- 50
- 55
- 60
- 9. Poblaciones de pacientes**
- Cualquier referencia a métodos de tratamiento se refiere al inhibidor o el anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
- 65 Aquí se proporciona un inhibidor o un anticuerpo para su uso en métodos clínicos para tratar tumores malignos (por ejemplo, tumores sólidos refractarios avanzados y neoplasias malignas hematológicas) en un paciente humano que

- 5 usan una inmunoterapia descrita aquí, por ejemplo, una combinación de un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1), en donde la muestra se predice que responde al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positiva a LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.
- 10 Los ejemplos de los cánceres y/o tumores malignos que pueden ser tratados usando los métodos de la invención incluyen el cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de los huesos, cáncer de páncreas, cáncer de la piel, cáncer oral, cáncer de la cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células 15 pequeñas, NSCLC, melanoma maligno intraocular o cutáneo, cáncer renal, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer del recto, cáncer de la región anal, cáncer del estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello (SCCHN), linfoma no de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroideas, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de inicio en la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de las células escamosas, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen aquellos 20 inducidos por asbestos, neoplasias hematológicas que incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de las células B, linfoma de Hodgkin/linfoma de las células B mediastinal primario, linfomas no de Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoide crónica, linfoma folicular, linfoma de las células B difusas grandes, linfoma de Burkitt, linfoma de las células grandes inmunoblásticas, linfoma linfoblástico de las células B germinales, linfoma de las células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma de las células B anaplásicas, 25 linfoma de las células T, y linfoma linfoblástico-T precursor, y cualquier combinación de los cánceres. La presente invención también es aplicable al tratamiento de cánceres metastásicos. En las modalidades, el cáncer es el carcinoma de las células renales (RCC), carcinoma de la unión gástrica/gastroesofágica, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello (SCCHN), carcinoma hepatocelular, o carcinoma urotelial.
- 30 35 En ciertas modalidades, el melanoma es el melanoma no resecable o metastásico. En las modalidades, el paciente fue tratado previamente con un anticuerpo de anti-PD-1 o de anti-PD-L1. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor que expresa LAG-3. En las modalidades particulares, el tumor es un tumor que expresa LAG-3 con una expresión de LAG-3 $\geq 1\%$.
- 40 45 En una modalidad, el paciente humano sufre de melanoma metastásico no resecable y fue tratado previamente con un inhibidor metastásico de anti-PD-1 o de anti-PD-L1. En una modalidad particular, el paciente humano sufre de melanoma metastásico no resecable y fue tratado previamente con un inhibidor metastásico de anti-PD-1 o de anti-PD-L1 y el tumor es un tumor que expresa LAG-3. En una modalidad, el paciente humano sufre de melanoma metastásico no resecable y fue tratado previamente con un inhibidor metastásico de anti-PD-1 o de anti-PD-L1 y el tumor es un tumor que expresa LAG-3. En cierta modalidad, el paciente humano sufre de melanoma metastásico no resecable y fue tratado previamente con un inhibidor metastásico de anti-PD-1 o de anti-PD-L1 y el tumor es un tumor que expresa LAG-3 con una expresión de LAG-3 $\geq 1\%$.
- 50 55 60 65 En una modalidad, el paciente humano sufre de un tumor maligno que es refractario al tratamiento con un inhibidor del punto de control inmunológico. En otra modalidad, el paciente sufre de un tumor maligno que es refractario al tratamiento con un inhibidor de PD-1. En otra modalidad, el paciente sufre de un tumor maligno que es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-1. En otra modalidad, el paciente sufre de un tumor maligno que es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-L1. En algunas modalidades, el tumor maligno es el cáncer gástrico, cáncer renal, HCC, SCCHN, o NSCLC.
- En una modalidad, el paciente humano sufre de melanoma. En otra modalidad, el paciente sufre de melanoma que es refractario al tratamiento con un inhibidor del punto de control inmunológico. En otra modalidad, el paciente sufre de melanoma que es refractario al tratamiento con un inhibidor de PD-1. En otra modalidad, el paciente sufre de melanoma que es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-1. En otra modalidad, el paciente sufre de melanoma que es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-L1. En otra modalidad, el paciente sufre de melanoma que es refractario al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-L1.
- En una modalidad, el paciente humano sufre de melanoma, cáncer gástrico, cáncer renal, HCC, SCCHN, o NSCLC. En una modalidad, el paciente humano sufre de melanoma.
- En una modalidad, el paciente humano sufre de NSCLC o un cáncer relacionado con el virus (por ejemplo, un tumor relacionado con el virus del papiloma humano (VPH) o adenocarcinoma gástrico. En una modalidad particular, el tumor relacionado con el VPH es el cáncer de cabeza y cuello (HNC) + VPH. En otra modalidad particular, el adenocarcinoma gástrico está asociado con la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV).
- Los pacientes pueden ser probados o seleccionados para uno o más de los atributos clínicos descritos anteriormente,

previo a, durante o después del tratamiento.

De acuerdo con los métodos descritos aquí, los tumores malignos se pueden probar para determinar la expresión de LAG-3. En algunas modalidades, los tumores malignos tratados de acuerdo con los métodos descritos aquí son tumores positivos a LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno es un melanoma positivo a LAG-3. En otra modalidad, el tumor maligno es un cáncer gástrico, cáncer renal, HCC, SCCHN, o NSCLC positivos a LAG-3.

5 En algunas modalidades, al menos aproximadamente 0,5 %, al menos aproximadamente 0,75 %, al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 1,25 %, al menos aproximadamente 1,5 %, al menos aproximadamente 1,75 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 % de las células del número total de células en un tumor de melanoma positivo a LAG-3 expresan LAG-3.

10 En algunas modalidades, al menos aproximadamente 0,5 %, al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, o al menos aproximadamente 30 % del número total de células de un tumor maligno expresan LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno es el melanoma, cáncer gástrico, cáncer renal, HCC, SCCHN, o NSCLC.

15 20 De acuerdo con los métodos descritos aquí, los tumores malignos se pueden probar para determinar la expresión de LAG-3 y de PD-L1. En algunas modalidades, los tumores malignos tratados de acuerdo con los métodos descritos aquí son tumores positivos a PD-L1, positivos a LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno es un melanoma positivo a PD-L1, positivo a LAG-3. En otra modalidad, el tumor maligno es un cáncer gástrico, cáncer renal, HCC, SCCHN, o NSCLC positivos a PD-L1, positivos a LAG-3.

25 30 En algunas modalidades, los tumores malignos tratados de acuerdo con los métodos descritos aquí son tumores negativos a PD-L1, positivos a LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno es un melanoma negativo a PD-L1, positivo a LAG-3. En otra modalidad, el tumor maligno es un cáncer gástrico, cáncer renal, HCC, SCCHN, o NSCLC negativos a PD-L1, positivos a LAG-3.

10. Inmunoterapias

35 Cualquier referencia a inmunoterapia se refiere al inhibidor o el anticuerpo de la presente invención para su uso en dicha inmunoterapia.

40 En un aspecto, las inmunoterapias provistas aquí involucran la administración de un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y otro anticuerpo que bloquea un receptor inmunológico del inhibidor (por ejemplo, un receptor, el cual al unirse a su ligando natural, inhibe/neutraliza la actividad, tal como una actividad citotóxica), particularmente un anticuerpo de anti-PD-1 o un anticuerpo de anti-PD-L1, para tratar un sujeto que tiene un tumor maligno (por ejemplo, tumores sólidos refractarios avanzados o neoplasias malignas hematológicas), en donde el sujeto es un paciente humano y se predice que responde al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno es positiva a LAG-3, en donde la muestra es positiva a LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.

45 50 En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo de anti-LAG-3 y un anticuerpo de anti-PD-1 en combinación de acuerdo con un régimen de dosificación clínica definido, para tratar sujetos que tienen un tumor maligno (por ejemplo, un tumor sólido refractario avanzado). En una modalidad particular, el anticuerpo de anti-LAG-3 es BMS-986016. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 es BMS-936558. En otra modalidad, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta efectiva).

55 60 En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo de anti-LAG-3 y un anticuerpo de anti-PD-L1 en combinación de acuerdo con un régimen de dosificación clínica definido, para tratar sujetos que tienen un tumor maligno (por ejemplo, un tumor sólido refractario avanzado). En una modalidad particular, el anticuerpo de anti-LAG-3 es BMS-986016. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-L1 es BMS-936559. En otra modalidad, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta efectiva).

65 70 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de anti-LAG-3 de acuerdo con un régimen de dosificación clínica definido, para tratar sujetos que tienen un tumor maligno (por ejemplo, un tumor sólido refractario avanzado). En una modalidad particular, el anticuerpo de anti-LAG-3 es BMS-986016. En otra modalidad, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta efectiva).

75 Como se usa aquí, la administración adyuvante o combinada (coadministración) incluye la administración simultánea de los compuestos en la misma o diferente forma de dosificación, o una administración separada de los compuestos (por ejemplo, una administración secuencial). Así, por ejemplo, los anticuerpos de anti-LAG-3 y de anti-PD-1 se pueden

administrar simultáneamente en una sola formulación. De manera alternativa, los anticuerpos de anti-LAG-3 y de anti-PD-1 se pueden formular para la administración separada y se administran de manera simultánea o secuencial (por ejemplo, se administra un anticuerpo dentro de aproximadamente 30 minutos antes de la administración del segundo anticuerpo).

- 5 Por ejemplo, el anticuerpo de anti-PD-1 se puede administrar primero seguido por (por ejemplo, inmediatamente seguido por) la administración del anticuerpo de anti-LAG-3, o viceversa. En una modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 se administra antes de la administración del anticuerpo de anti-LAG-3. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 se administra después de la administración del anticuerpo de anti-LAG-3. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran simultáneamente. Tal administración simultánea o secuencial preferentemente conduce a que ambos anticuerpos estén presentes simultáneamente en los pacientes tratados.
- 10

11. Protocolos de tratamiento

- 15 Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluyen administrar al paciente una cantidad efectiva de un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3).

En algunas modalidades, un protocolo de tratamiento adecuado para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluye, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de anti-LAG-3, tal como uno que comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:3, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:5, en donde el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran al menos cuatro dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 a una dosis de respuesta plana de aproximadamente 1, 3, 10, 20, 50, 80, 100, 130, 150, 16, 180, 200, 240 o 280 mg. En otra modalidad, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 a una dosis de 0,01, 0,03, 0,25, 0,1, 0,3, 1 o 3, 5, 8 o 10 mg/kg de peso corporal.

20 Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluyen administrar al paciente una cantidad efectiva de un inhibidor de la ruta de PD1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD1).

25 En algunas modalidades, un protocolo de tratamiento adecuado para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluye, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de anti-PD-1, tal como uno que comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:19, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:21, en donde el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran al menos cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-1 a una dosis de respuesta plana de aproximadamente 50, 80, 100, 130, 150, 180, 200, 240 o 280 mg. En otra modalidad, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-1 a una dosis de 0,1, 0,3, 1, 3, 5, 8 o 10 mg/kg de peso corporal.

- 30 Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluyen administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de anti-CTLA-4.

35 Un protocolo de tratamiento adecuado para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluye, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de anti-CTLA-4, en donde el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran al menos cuatro dosis del anticuerpo de anti-CTLA-4 a una dosis de respuesta plana de aproximadamente 50, 80, 100, 130, 150, 180, 200, 240 o 280 mg. En otra modalidad, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-CTLA-4 a una dosis de 0,1, 0,3, 1, 3, 5, 8 o 10 mg/kg de peso corporal.

- 40 Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluyen administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de anti-CTLA-4.
- 45

45 En un aspecto, los protocolos de tratamiento adecuados para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluyen administrar al paciente una cantidad efectiva de cada uno de un inhibidor de LAG3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1).

50 En algunas modalidades, un protocolo de tratamiento adecuado para tratar un tumor maligno en un paciente humano incluye, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de cada uno de:

- 55 (a) un anticuerpo de anti-LAG-3, tal como uno que comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:3, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:5,
- 60 (b) un anticuerpo de anti-PD-1, tal como uno que comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:19, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:21,

65 en donde el método comprende al menos un ciclo de administración, en donde el ciclo es un período de ocho semanas, en donde para cada uno de al menos un ciclo, se administran al menos cuatro dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 a una dosis de respuesta plana de aproximadamente 1, 3, 10, 20, 50, 80, 100, 130, 150, 16, 180, 200, 240 o 280 mg y

se administran al menos cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-1 a una dosis de respuesta plana de aproximadamente 50, 80, 100, 130, 150, 180, 200, 240 o 280 mg. En otra modalidad, se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 a una dosis de 0,01, 0,03, 0,25, 0,1, 0,3, 1 o 3, 5, 8 o 10 mg/kg de peso corporal y se administran cuatro dosis del anticuerpo de anti-PD-1 a una dosis de 0,1, 0,3, 1, 3, 5, 8 o 10 mg/kg de peso corporal.

- 5 En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a las siguientes dosis:
- (a) 3 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 80 mg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 (b) 3 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 10 (c) 20 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 (d) 80 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 160 mg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 (e) 80 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 (f) 160 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1; o
 15 (g) 240 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1.
- En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a una dosis de 20 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 80 mg de un anticuerpo de anti-PD-1. En una modalidad, el tumor es el cáncer de pulmón.
- 20 En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a una dosis de 20 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1.
- En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a una dosis de 80 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1. En una modalidad, el tumor es el melanoma (por ejemplo, el melanoma experimentado con el anticuerpo de anti-PD1/PD-L1 o el tratamiento del melanoma de primera línea), RCC (por ejemplo, RCC sin tratamiento previo con IO), NSCLC (por ejemplo, NSCLC experimentado con el anticuerpo de anti-PD1/PD-L1), cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer gástrico sin tratamiento previo con IO), HCC (por ejemplo, HCC sin tratamiento previo con IO), NSCLC (por ejemplo, tratamiento de primera línea de NSCLC), o SCCHN (por ejemplo, SCCHN sin tratamiento previo con IO).
- 30 En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a una dosis de 240 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1.
- 35 En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a una dosis de 160 mg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg de un anticuerpo de anti-PD-1. En una modalidad, el tumor es el melanoma (por ejemplo, el melanoma experimentado con el anticuerpo de anti-PD1/PD-L1 o el tratamiento del melanoma de primera línea), RCC (por ejemplo, RCC sin tratamiento previo con IO), NSCLC (por ejemplo, NSCLC experimentado con el anticuerpo de anti-PD1/PD-L1), cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer gástrico sin tratamiento previo con IO), HCC (por ejemplo, HCC sin tratamiento previo con IO), NSCLC (por ejemplo, tratamiento de primera línea de NSCLC), o SCCHN (por ejemplo, SCCHN sin tratamiento previo con IO). En otra modalidad, el tumor es el linfoma de Hodgkin (por ejemplo, linfoma de Hodgkin tratado con IO previamente); DLBCL, linfoma de Hodgkin sin tratamiento previo con PD-1/PD-L1, o linfoma de Hodgkin progresivo/refractario al PD-1/PD-L1.
- 40 En otra modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 se administran a las siguientes dosis:
- (a) 0,3 mg/kg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 1 mg/kg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 (b) 0,3 mg/kg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 45 (c) 0,25 mg/kg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-PD-1;
 (d) 1 mg/kg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-PD-1; o
 (e) 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-LAG-3 y 3 mg/kg de un anticuerpo de anti-PD-1.
- 50 En una modalidad, la dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 se calcula por peso corporal, por ejemplo, mg/kg de peso corporal. En otra modalidad, la dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 es una dosis de respuesta plana-fijada. En otra modalidad, la dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 varía con el tiempo.
- 55 Por ejemplo, el anticuerpo de anti-LAG-3 y/o el anticuerpo de anti-PD-1 se pueden administrar inicialmente a una alta dosis y se pueden reducir con el tiempo. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 y/o el anticuerpo de anti-PD-1 se administran inicialmente a una baja dosis y aumentan con el tiempo.
- 60 En otra modalidad, la cantidad de los anticuerpos de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 administrados es constante para cada dosis. En otra modalidad, la cantidad del anticuerpo administrado varía con cada dosis. Por ejemplo, la dosis de mantenimiento (o continuación) del anticuerpo puede ser mayor o igual que la dosis de carga que se administra primero. En otra modalidad, la dosis de mantenimiento del anticuerpo puede ser menor o igual que la dosis de carga.
- 65 En otra modalidad, los anticuerpos de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 son formulados para la administración intravenosa. En una modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 se administra en los días 1, 15, 29, y 43 de cada ciclo. En otra modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 se administra en los días 1, 15, 29, y 43 de cada ciclo.

- En otras modalidades, los anticuerpos de anti-LAG-3 y/o de anti-PD-1 se administran aproximadamente una vez por semana, una vez aproximadamente cada dos o tres semanas, aproximadamente una vez al mes o mientras se observe un beneficio clínico o hasta que exista una respuesta completa, una enfermedad progresiva confirmada o una toxicidad que no se puede manejar.
- 5 En otra modalidad, un ciclo de administración es de ocho semanas, el cual se puede repetir, cuando sea necesario. En otra modalidad, el tratamiento consiste de hasta 12 ciclos.
- 10 En otra modalidad, se administran 4 dosis del anticuerpo de anti-PD-1 por ciclo de ocho semanas. En otra modalidad, se administran 4 dosis del anticuerpo de anti-LAG-3 por ciclo de ocho semanas.
- 15 En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 y el anticuerpo de anti-LAG-3 se administran como una primera línea de tratamiento (por ejemplo, el tratamiento inicial o el primer tratamiento). En otra modalidad, el anticuerpo de anti-PD-1 y el anticuerpo de anti-LAG-3 se administran como una segunda línea de tratamiento (por ejemplo, después del tratamiento inicial o el primer tratamiento, incluyendo después de una recaída y/o en donde el primer tratamiento ha fallado).
- 20 Las siguientes modalidades que se refieren a un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1 han de entenderse que especifican el inhibidor de LAG-3 como un anticuerpo anti-LAG-3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 como un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo un anticuerpo anti-PD-L2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Además, en las siguientes modalidades, el paciente humano a tratar se predice que responde al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positiva para LAG-3 y la muestra es positiva para LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor. Cualquier referencia a los métodos de tratamiento se refiere al inhibidor o el anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano mediante terapia. En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar un paciente humano con melanoma no resecable o metastásico, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de PD-1. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para tratar un paciente humano con melanoma no resecable o metastásico, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de PD-L1. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para tratar un paciente humano con melanoma no resecable o metastásico, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de PD-1, y en donde el melanoma expresa LAG-3. En una modalidad, la invención se refiere a un método para tratar un paciente humano con melanoma no resecable o metastásico, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de PD-L1, y en donde el melanoma expresa LAG-3. En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar un paciente humano con melanoma que ha progresado durante o después del tratamiento con un inhibidor de la ruta de PD-1 o un inhibidor de la ruta de PD-L1, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de anti-PD-1. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para tratar un paciente humano con melanoma que ha progresado durante o después del tratamiento con un inhibidor de la ruta de PD-1 o un inhibidor de la ruta de PD-L1, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de anti-PD-L1. En ciertas modalidades, la invención proporciona un método para tratar un paciente humano con melanoma que ha progresado durante o después del tratamiento con un inhibidor de la ruta de PD-1 o un inhibidor de la ruta de PD-L1, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de anti-PD-1, y en donde el melanoma expresa LAG-3. En una modalidad, el inhibidor o el anticuerpo es para su uso en un método para tratar un paciente humano con melanoma que ha progresado durante o después del tratamiento con un inhibidor de la ruta de PD-1 o un inhibidor de la ruta de PD-L1, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 y un inhibidor de la ruta de PD-1; en donde el paciente ha sido tratado previamente con un inhibidor de anti-PD-L1, y en donde el melanoma expresa LAG-3. En algunas modalidades, la expresión de LAG-3 del melanoma es $\geq 1\%$. En una modalidad, el anticuerpo de PD-1 es el nivolumab. En una modalidad, el anticuerpo de LAG-3 es BMS-986016. En una modalidad, el inhibidor de la ruta de PD-1 administrado es un anticuerpo de anti-PD-L1.
- 65 En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 es BMS-986016 y el anticuerpo de anti-PD-1 es el nivolumab. En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 es MK-4280 y el anticuerpo de anti-PD-1 es el pembrolizumab. En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 es REGN3767 y el anticuerpo de anti-PD-1 es REGN2810. En una modalidad, el anticuerpo de anti-LAG-3 es LAG525 (publicación internacional número WO2015/138920) y el anticuerpo de anti-PD-1 es PDR001.

En otro aspecto, la invención presenta cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente, en donde el anticuerpo de anti-PD-1 es reemplazado por, o combinado con, un anticuerpo de anti-PD-L1 o de anti-PD-L2.

- 5 En otro aspecto, la invención presenta cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente, en donde la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1) activa las células T del paciente. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD-1) induce la expresión de los marcadores de activación por medio de las 10 células T del paciente. La expresión de los marcadores de activación por medio de las células T del paciente se puede detectar analizando una muestra del paciente, por ejemplo, los linfocitos periféricos o los linfocitos infiltrantes del tumor usando la citometría de flujo.
- 15 En otro aspecto, la invención presenta cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente, en donde la administración del anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo conduce a la ocupación de al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos 20 aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o aproximadamente 100 % de los receptores de LAG-3 en las células T del paciente. En algunas modalidades, las células T son células T CD8+. En algunas modalidades, las células T son células T infiltrantes del tumor.
- 25 En otro aspecto, la invención presenta cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente, en donde el protocolo de tratamiento comprende además la administración de al menos un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, al menos un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, al menos un agente terapéutico adicional es un inhibidor del punto de control inmunológico.

12. Resultados

- 30 Con respecto a las lesiones objetivo, las respuestas a la terapia pueden incluir:

Respuesta completa (CR) (RECIST V1.1)	Desaparición de todas las lesiones objetivo. Cualquier ganglio linfático patológico (ya sea objetivo o no objetivo) debe tener una reducción en el eje corto hasta < 10 mm.
Respuesta parcial (PR) (RECIST V1.1)	Al menos una reducción del 30 % en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, tomando como referencia los diámetros de la suma de la línea base.
Enfermedad progresiva (PD) (RECIST V1.1)	Al menos un aumento del 20 % en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, tomando como referencia la suma más pequeña en el estudio (esto incluye la suma de la línea base si esta es la más pequeña en el estudio). Además del aumento relativo del 20 %, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm. (Nota: la aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión).
Enfermedad estable (SD) (RECIST V1.1)	Ni una contracción suficiente para calificar para PR ni un aumento suficiente para calificar para PD, tomando como referencia los diámetros de la suma más pequeña durante el estudio.
Respuesta completa relacionada inmunológicamente (irCR) (irRECIST)	Desaparición de todas las lesiones objetivo. Cualquier ganglio linfático patológico (ya sea objetivo o no objetivo) debe tener una reducción en el eje corto hasta < 10 mm.
Respuesta parcial relacionada inmunológicamente (irPR) (irRECIST)	Al menos una reducción del 30% en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo y todas las nuevas lesiones medibles (es decir, el cambio porcentual en la carga tumoral), tomando como referencia los diámetros de la suma de la línea base. Nota: la aparición de nuevas lesiones medibles se tiene en cuenta en la carga tumoral general, pero no califica automáticamente como enfermedad progresiva hasta que la suma de los diámetros aumenta en > 20 % comparado con el nadir.
Enfermedad progresiva relacionada inmunológicamente (irPD) (irRECIST)	Al menos un aumento del 20 % en la carga tumoral (es decir, la suma de los diámetros de las lesiones objetivo y cualquier nueva lesión medible) tomando como referencia la suma más pequeña en el estudio (esto incluye la suma de la línea base si esta es la más pequeña en el estudio). Además del aumento relativo del 20 %, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm. Las evaluaciones del tumor que usan criterios relacionados inmunológicamente para la enfermedad progresiva incorporan la contribución de nuevas lesiones medibles. Cada cambio porcentual neto en la carga del tumor por evaluación se tiene en cuenta para las características cinéticas de tamaño y crecimiento de las lesiones nuevas y viejas a medida que aparecen.

(continuación)

Enfermedad estable relacionada inmunológicamente (irSD) (irRECIST)	Ni una contracción suficiente para calificar para irPR ni un aumento suficiente para calificar para irPD, tomando como referencia los diámetros de suma más pequeña durante el estudio.
--	---

Con respecto a las lesiones no objetivo, las respuestas a la terapia pueden incluir:

Respuesta completa (CR) (RECIST V1.1)	Desaparición de todas las lesiones no objetivo. Todos los ganglios linfáticos no deber ser patrológicos en tamaño (eje corto < 10 mm).
Sin CR/sin PD (RECIST V1.1)	Persistencia de una o más lesión(es) no objetivo.
Enfermedad progresiva (PD) (RECIST V1.1)	<i>Progresión inequívoca</i> de las lesiones no objetivo existentes. La aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión.
Respuesta completa relacionada inmunológicamente (irCR) (irRECIST)	Desaparición de todas las lesiones no objetivo. Todos los ganglios linfáticos no deber ser patrológicos en tamaño (eje corto < 10 mm).
Enfermedad progresiva relacionada inmunológicamente (irPD) (irRECIST)	Los aumentos en el número o tamaño de la(s) lesión(es) no objetivo no constituyen una enfermedad progresiva a menos que/hasta que la carga del tumor aumente en 20 % (es decir, la suma de los diámetros en el nadir de las lesiones objetivo y cualesquiera nuevas lesiones medibles aumentan en la cantidad requerida). Las lesiones no objetivo no se consideran en la definición de enfermedad estable y respuesta parcial.

- 5 Los pacientes tratados de acuerdo con los métodos descritos aquí preferentemente experimentan una mejora en al menos un signo del cáncer. En una modalidad, la mejora se mide por medio de una reducción en la cantidad y/o tamaño de las lesiones tumorales medibles. En otra modalidad, las lesiones se pueden medir en radiografías de tórax o en películas de CT o MRI. En otra modalidad, se puede usar la citología o histología para evaluar la reactividad a una terapia.
- 10 En una modalidad, el paciente tratado exhibe una respuesta completa (CR), una respuesta parcial (PR), una enfermedad estable (SD), una enfermedad completa relacionada inmunológicamente (irCR), una respuesta parcial relacionada inmunológicamente (irPR), o una enfermedad estable relacionada inmunológicamente (irSD). En otra modalidad, el paciente tratado experimenta una contracción del tumor y/o una reducción en la tasa de crecimiento, es decir, una supresión del crecimiento del tumor. En otra modalidad, se reduce o inhibe la proliferación celular no deseada. Todavía en otra modalidad, pueden ocurrir uno o más de los siguientes: se puede reducir el número de células cancerosas; se puede reducir el tamaño del tumor; se puede inhibir, retardar, ralentizar, o detener la infiltración de las células cancerosas en los órganos periféricos; se puede ralentizar o inhibir la metástasis tumoral; se puede inhibir el crecimiento del tumor; se puede prevenir o retardar la recurrencia del tumor; se pueden aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.
- 15 En otras modalidades, la administración de las cantidades efectivas de una combinación del anticuerpo de anti-LAG-3 y de anti-PD-1 de acuerdo con cualquiera de los métodos provistos aquí, produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste de una reducción del tamaño de un tumor, una reducción en el número de las lesiones metastásicas que aparecen con el tiempo, remisión completa, remisión parcial, o enfermedad estable.
- 20 Todavía en otras modalidades, los métodos de tratamiento producen una tasa de beneficio clínico (CBR=CR+PR+SD \geq 6 meses) mejor que aquella lograda por medio de un método de tratamiento que no comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor antes del tratamiento, (ii) seleccionar un tumor positivo a LAG-3 para el tratamiento, (iii) tratar un tumor que ha sido identificado como positivo a LAG-3 antes del tratamiento, o (iv) cualquier combinación de las mismas. En otras modalidades, la mejora de la tasa de beneficio clínico es de aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más comparado con un método de tratamiento que no comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor antes del tratamiento, (ii) seleccionar un tumor positivo a LAG-3 para el tratamiento, (iii) tratar un tumor que ha sido identificado como positivo a LAG-3 antes del tratamiento, o (iv) cualquier combinación de las mismas.
- 25 Todavía en otras modalidades, los métodos de tratamiento producen una tasa de respuesta objetivo (ORR=CR+PR) de al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o aproximadamente 100 %. En una modalidad, los métodos de tratamiento producen una tasa de respuesta objetivo de al menos aproximadamente 15 %, en donde el tumor maligno es un melanoma positivo a LAG-3 que es resistente al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-1 o de anti-PD-L1. En algunas modalidades, la duración promedio de la respuesta es \geq 3 meses, \geq 6 meses, \geq 12 meses, o \geq 18 meses. En una modalidad, la duración promedio de la respuesta es \geq 6 meses. En algunas modalidades, la frecuencia de los pacientes con una duración de

la respuesta \geq 6 meses es de al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o 100 %.

- 5 Todavía en otras modalidades, los métodos de tratamiento producen una tasa de respuesta objetivo (ORR=CR+PR) mejor que aquella lograda por medio de un método de tratamiento que no comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en un muestra del tumor antes del tratamiento, (ii) seleccionar un tumor positivo a LAG-3 para el tratamiento, (iii) tratar un tumor que ha sido identificado como positivo a LAG-3 antes del tratamiento, o (iv) cualquier combinación de las mismas. En otras modalidades, la mejora de la tasa de respuesta objetivo es de 10 aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más comparado con un método de tratamiento que no comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor antes del tratamiento, (ii) seleccionar un tumor positivo a LAG-3 para el tratamiento, (iii) tratar un tumor que ha sido identificado como positivo a LAG-3 antes del tratamiento, o (iv) cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, la duración promedio de la respuesta es \geq 3 meses, \geq 6 meses, \geq 12 meses, o \geq 18 meses. En una modalidad, la duración 15 promedio de la respuesta es \geq 6 meses.

Todavía en otras modalidades, los métodos de tratamiento producen una tasa de control de la enfermedad (DRR=CR+PR+SD) de al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos 20 aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o aproximadamente 100 %. En una modalidad, los métodos de tratamiento producen una tasa de control de la enfermedad de al menos 25 aproximadamente 70 %, en donde el tumor maligno es un melanoma positivo a LAG-3 que es resistente al tratamiento con un anticuerpo de anti-PD-1 o de anti-PD-L1. En algunas modalidades, la duración promedio de la respuesta es \geq 3 meses, \geq 6 meses, \geq 12 meses, o \geq 18 meses. En una modalidad, la duración promedio de la respuesta es \geq 6 meses. En algunas modalidades, la frecuencia de los pacientes con una duración de la respuesta \geq 6 meses es de al 30 menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o 100 %.

- 30 Todavía en otras modalidades, los métodos de tratamiento producen una tasa de control de la enfermedad (DRR=CR+PR+SD) mejor que aquella lograda por medio de un método de tratamiento que no comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor antes del tratamiento, (ii) seleccionar un tumor positivo a LAG-3 para el tratamiento, (iii) tratar un tumor que ha sido identificado como positivo a LAG-3 antes del tratamiento, o (iv) cualquier combinación de las mismas. En otras modalidades, la mejora de la tasa de control de 35 la enfermedad es de aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más comparado con un método de tratamiento que no comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de LAG-3 en una muestra del tumor antes del tratamiento, (ii) seleccionar un tumor positivo a LAG-3 para el tratamiento, (iii) tratar un tumor que ha sido identificado como positivo a LAG-3 antes del tratamiento, o (iv) cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, la duración promedio de la respuesta es \geq 3 meses, \geq 6 meses, \geq 12 meses, o \geq 18 meses. En una 40 modalidad, la duración promedio de la respuesta es \geq 6 meses.

13. Kits y formas de dosificación unitaria

- 45 Un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo de anti-LAG-3 puede usarse para ensayar la expresión de LAG-3 como un biomarcador para la selección de los pacientes para la inmunoterapia o para predecir la eficacia de la inmunoterapia. Los kits generalmente incluyen una etiqueta que indica el uso propuesto de los contenidos del kit e instrucciones para su uso. El término "etiqueta" incluye cualquier material escrito o grabado suministrado sobre o con el kit, o que acompaña de otra manera al kit. Un kit de diagnóstico puede comprender un primer anticuerpo de anti-LAG-3 para ensayar, detectar, y/o cuantificar la expresión de LAG-3 se empaqueta conjuntamente con al menos un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un segundo anticuerpo de anti-LAG-3, un anticuerpo de anti-PD-1, un anticuerpo de anti-PD-L1, y/o un anticuerpo de anti-CTLA-4) para el tratamiento de un tumor positivo a LAG-3. El kit puede 50 comprender además un anticuerpo de anti-PD-L1 para ensayar, detectar, y/o cuantificar la expresión de PD-L1 como un biomarcador para predecir la eficacia de la inmunoterapia. En una modalidad, la inmunoterapia comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-LAG-3) y un inhibidor de la ruta de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo de anti-PD1 o un anticuerpo de anti-PD-L1).

55 Un kit de diagnóstico puede comprender un anticuerpo monoclonal de LAG-3 anti-humano para ensayar, detectar, y/o cuantificar la expresión de LAG-3. Véase, por ejemplo, J. Matsuzaki, *et al.*; PNAS 107, 7875 (2010).

- 60 También se proporcionan (pero no se reivindican) aquí kits terapéuticos que incluyen una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de anti-LAG-3, tal como BMS-986016, y un anticuerpo de anti-PD-1, tal como el nivolumab, y un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad terapéuticamente efectiva, en donde los kits son para su uso en el tratamiento de un tumor maligno en un paciente humano, en donde el paciente se predice que responde al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positivo para LAG-3 y en donde la muestra es 65 positiva para LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-

- 3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor. En ciertas modalidades de un kit terapéutico, el anticuerpo de anti-LAG-3 se empaqueta conjuntamente con un anticuerpo de anti-PD-1 en una forma de dosificación unitaria. Los kits opcionalmente también pueden incluir instrucciones, por ejemplo, que comprenden programas de administración, para permitir que un especialista médico (por ejemplo, un médico, enfermera, o paciente) administre la composición contenida allí para administrar la composición a un paciente que tiene cáncer (por ejemplo, un tumor sólido). El kit también puede incluir una jeringa.
- 5 Opcionalmente, los kits de diagnóstico y/o terapéuticos incluyen múltiples paquetes de las composiciones farmacéuticas de una sola dosis, cada una que contiene una cantidad efectiva del anticuerpo de anti-LAG-3 o de anti-PD-1 para una sola administración de acuerdo con los métodos provistos anteriormente. Los instrumentos o dispositivos necesarios para administrar la(s) composición(es) farmacéutica(s) también pueden estar incluidos en los kits. Por ejemplo, un kit puede proporcionar una o más jeringas prellenadas que contienen una cantidad del anticuerpo de anti-LAG-3 o de anti-PD-1.
- 10 15 En un ejemplo que no se reivindica, la divulgación proporciona un kit para su uso para tratar un paciente afectado por un tumor maligno, el kit, por ejemplo, que comprende:
- 20 (a) una dosis de un anticuerpo de anti-LAG-3, tal como uno que comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:3, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:5;
- 25 (b) una dosis de un anticuerpo de anti-PD-1, tal como uno que comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:19, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO:21; y
- 30 (c) instrucciones para usar el anticuerpo de anti-LAG-3 y el anticuerpo de anti-PD-1 en el tratamiento de un tumor maligno en un paciente humano, en donde el paciente se predice que responde al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positiva para LAG-3 y en donde la muestra es positiva para LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.
- 35 En algunas modalidades, el tumor maligno es un tumor positivo a LAG-3. En algunas modalidades, el tumor maligno es un tumor positivo a LAG-3/PD-L1. En algunas modalidades, el tumor maligno es un tumor positivo a LAG-3/negativo a PD-L1.
- 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10

almacenó a -20 °C. Un anticuerpo de control del isótipo de IgG de ratón se adquirió de BD Pharmingen (San Jose, CA) y se almacenó a 2-8 °C.

Inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica se llevó a cabo de acuerdo con las técnicas estándares de laboratorio.

- 5 Preprocesamiento. El procedimiento para el análisis de IHC del LAG3 (clon de ratón 17B4) se llevó a cabo por medio de una detección automatizada a temperatura ambiente (TA) sobre el aparato de Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) usando reactivos disponibles comercialmente. Las muestras se seccionaron con un espesor de 4 micrones, se montaron sobre portaobjetos de vidrio con carga positiva, se secaron, se hornearon, se desparafinaron, y se rehidrataron fuera de la línea. Luego, los tejidos se colocaron sobre el aparato de tinción automático y se sometieron a un tratamiento previo usando la solución de recuperación del epítopo 1 (# de catálogo AR9961, Leica) durante 20 minutos a 100 °C seguido por un enjuague con una solución amortiguadora de lavado de unión (# de catálogo AR9590, Leica) a TA.
- 10 15 Los tejidos de ensayo del cromógeno de DAB se incubaron con un bloque de peróxido (# de catálogo DS9800, Leica) durante 5 minutos seguido por 3 enjuagues en una solución amortiguadora de lavado de unión. Los tejidos se incubaron con un bloque de proteínas, libre de suero (# de catálogo X0909, Dako, Carpinteria, CA) durante 5 minutos, seguido por una incubación con el anticuerpo primario o el reactivo de control negativo del isótipo diluido en un diluyente del anticuerpo primario de unión (# de catálogo AR9352, Leica) durante 30 minutos y 3 enjuagues en una 20 solución amortiguadora de lavado de unión. Los tejidos se incubaron con una solución post primaria (kit de detección de refinación del polímero de unión, # de catálogo DS9800, Leica) durante 8 minutos seguido por 3 enjuagues en una solución amortiguadora de lavado de unión durante 2 minutos cada uno. Los tejidos se incubaron con un polímero (kit de detección de refinación del polímero de unión) durante 8 minutos seguido por 3 enjuagues en una solución 25 amortiguadora de lavado de unión durante 2 minutos cada uno y 2 enjuagues en agua destilada. Los tejidos se incubaron con DAB (kit de detección de refinación del polímero de unión) durante 10 minutos seguido por 4 enjuagues en agua destilada.
- 30 Los tejidos de ensayo del cromógeno rojo se incubaron luego con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 minutos seguido por 3 enjuagues en una solución amortiguadora de lavado de unión. Los tejidos se incubaron con un bloque de proteínas, libre de suero durante 5 minutos, seguido por una incubación con el anticuerpo primario o el reactivo de control negativo del isótipo diluido en un diluyente del anticuerpo primario de unión durante 30 minutos y 3 enjuagues en una solución amortiguadora de lavado de unión. Los tejidos se incubaron con un AP post primario (# de catálogo DS9390, kit de detección rojo de refinación del polímero de unión, Leica) durante 20 minutos seguido por 3 enjuagues en una solución amortiguadora de lavado de unión durante 2 minutos cada uno. Los tejidos se incubaron con un AP 35 del polímero (kit de detección rojo de refinación del polímero de unión) durante 30 minutos seguido por 3 enjuagues en una solución amortiguadora de lavado de unión durante 2 minutos cada uno y 2 enjuagues en agua destilada. Los tejidos se incubaron con un kit de refinación rojo (kit de detección rojo de refinación del polímero de unión) durante 10 minutos seguido por 4 enjuagues en agua destilada.
- 40 40 Los tejidos del posprocesamiento se incubaron con hematoxilina (kit de detección de refinación del polímero de unión) durante 5 minutos seguido por un enjuague en agua destilada y un enjuague en una solución amortiguadora de lavado de unión. El montaje del cubreobjetos se llevó a cabo fuera de la línea usando un cubreobjetos de vidrio automatizado (Leica) de acuerdo con los procedimientos estándares.
- 45 Los portaobjetos se escanearon usando un sistema de Aperio Turbo AT (Aperio, Vista, CA) para producir imágenes completas del portaobjetos. Se proporciona una imagen JPEG 20X de cada tinción para este informe.
- 50 Los tejidos del análisis de imágenes teñidos con LAG3 (clon de ratón 17B4) usando un cromógeno de DAB o un cromógeno rojo se evaluaron por medio del análisis de imágenes con un algoritmo Nuclear v9 de Aperio. El ROI incluye el área del tejido del tumor con estroma interpuesto. Las áreas excluidas del análisis incluyen el tejido normal, áreas estromales más grandes, tejido necrótico, alquitrán (si es posible) y el dispositivo de tinción.
- 55 Se seleccionó un algoritmo nuclear porque las tinciones citoplásmicas grandes en las células pequeñas, tales como las células inmunológicas, frecuentemente oscurecen la hematoxilina en el núcleo. El algoritmo citoplásmico y de la membrana requiere la visualización de la hematoxilina en el núcleo para cuantificar una célula. El algoritmo nuclear tiene una característica llamada "orificios de llenado" que llenará la parte central de un linfocito si está presente la hematoxilina y lo registrará como una célula.
- 60 60 Evaluación inmunológica visual del patólogo. Un subconjunto de muestras dentro del intervalo dinámico también fueron evaluadas por un patólogo durante el QC del análisis de imágenes. El propósito de la evaluación inmunológica visual del patólogo es proporcionar un resultado de respaldo en el caso de que una evaluación del análisis de imágenes no produzca un resultado preciso como el considerado por un patólogo certificado por la junta. Las razones para la falla del análisis de imágenes pueden incluir, pero no están limitadas a: 1) contratinción luminosa; 2) tejido triturado; 3) presencia de alquitrán en los tejidos de NSCLC; 4) tinción de hemosiderina; o 5) presencia de melanina que impide la evaluación. La evaluación inmunológica visual del patólogo es el porcentaje de células inmunológicas positivas dentro de la región anotada (para imitar el algoritmo).

- 5 Validación-sensibilidad del ensayo de IHC del LAG3. Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad usando el ensayo de IHC del LAG3 (clon de ratón 17B4) optimizado en 247 tejidos humanos de FFPE (40 cánceres uroteliales de vejiga, 41 cánceres gástricos/GEJ, 41 HNSCC, 41 melanomas, 41 NSCLC, 43 RCC) para demostrar el intervalo dinámico del ensayo dentro de las 6 indicaciones. Todas las muestras fueron evaluadas por medio del análisis de imágenes de 1 ROI (tumor + estroma interpuesto) y un subconjunto de los tejidos (10 cada uno dentro de las 6 indicaciones) también fueron evaluados por medio de la evaluación inmunológica visual del patólogo.
- 10 En promedio, la expresión de LAG-3 (clon de ratón 17B4) fue más alta en el melanoma (3.54 %), seguido por el cáncer urotelial de vejiga (2.58 %), NSCLC (1.68 %), HNSCC (1.47 %), cáncer gástrico/GEJ (1.27 %), y RCC (1.24 %). La positividad varió de 0,01 % a 25,57 % con un promedio de 1,95 % y una mediana de 0,84 %. El uso de un umbral de 2 % demostró 192 tejidos negativos y 55 positivos (12 uroteliales de vejiga, 6 de cáncer gástrico/GEJ, 7 de HNSCC, 18 de melanoma, 8 de NSCLC, y 4 de RCC).
- 15 15 La figura 1 muestra los patrones de tinción de anti-LAG-3 observados en las muestras del tumor usando la IHC monoplex. Los patrones de tinción observados incluyeron la localización de la membrana/citoplásrica parcial, la localización semejante a puntos, y la localización de la membrana/citoplásrica completa.
- 20 20 La figura 2 muestra la distribución de la frecuencia de las células positivas a LAG-3 como una proporción de las células del tumor totales a través de varios tumores detectados por la IHC de LAG-3 monoplex.

EJEMPLO 2

- 25 Eficacia inicial del gen 3 de activación anti-linfocitos (anti-LAG-3; BMS-986016) en combinación con nivolumab en los pacientes con melanoma tratados previamente con una terapia con anti-PD1/PD-L1
- 30 El bloqueo simultáneo de los LAG-3 y PD-1 reguladores de las células T negativas puede funcionar sinergísticamente para restaurar la activación de las células T y mejorar la inmunidad antitumoral. Los datos de un estudio de fase 1/2a de BMS-986016 (mAb de IgG4 completamente humano que tiene como objetivo el LAG-3) ± nivolumab (mAb de IgG4 completamente humano que tiene como objetivo la PD-1) demostraron que la combinación fue bien tolerada y mostró una actividad antitumoral prometedora en los pacientes con melanoma que fueron refractarios a, o recayeron durante la terapia con anti-PD-1/PD-L1 previa (NCT01968109; Ascierto *et al.* J Clin Oncol. 2017;35(suppl) [resumen 9520]). A continuación se muestran los datos de la eficacia en los pacientes con melanoma avanzado que progresaron en la terapia con anti-PD-1/PD-L1 previa.

- 35 35 Este fue un estudio de fase I/IIa, de etiqueta abierta, de aumento de dosis y de expansión de la cohorte que evaluó la seguridad, la tolerabilidad, y la eficacia de BMS-986016 administrado solo o en combinación con el nivolumab en los pacientes con tumores sólidos avanzados. Los pacientes recibieron terapia de estudio por vía intravenosa una vez cada dos semanas durante un máximo de doce ciclos de tratamiento de 8 semanas. La dosis combinada para la expansión fue 80 mg de BMS-986016 + 240 mg de nivolumab.

40 El diseño del estudio y los puntos finales se muestran en las figuras 3A-3B y 17.

- 45 45 Los criterios de elegibilidad clave para los pacientes en la cohorte de expansión de IO previa al melanoma se muestran en las figuras 3A-3B.

- 50 50 Resultados. A partir del corte de datos del 7 de abril de 2017, se trajeron 212 pacientes, incluyendo 55 pacientes con melanoma que progresaron en la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa (mel previo a IO). De los 212 pacientes, el 61 % todavía estuvo en tratamiento en el corte de datos. De los 83 pacientes que interrumpieron el tratamiento, la razón principal fue la progresión de la enfermedad (86 %). De la cohorte de mel previo a IO, el 67 % de los pacientes tuvieron una enfermedad de M1C sin metástasis cerebral, el 15 % tuvo lactato deshidrogenasa (LDH) ≥ 2 veces el límite superior normal (ULN) y el 20 % tuvieron metástasis hepática. Figura 4.

- 55 55 Los pacientes en la cohorte de mel previo a IO fueron pretratados intensamente. Figura 5. De los 55 pacientes, el 76 % tuvo ≥ 2 terapias previas; el 40 % de los pacientes tuvo una enfermedad progresiva (PD) como la mejor respuesta a la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa.

- 60 60 La figura 6 muestra el estado de la expresión de LAG-3 de las primeras 40 muestras de melanoma experimentadas con IO. El 40 % (16/40) de las muestras fueron evaluadas como positivas a LAG-3 usando un corte ≥ 1 % en un ensayo de IHC monoplex.

- 65 65 Eficacia en la cohorte de IO previa al melanoma. La duración promedio del seguimiento para todos los pacientes evaluables para la eficacia (n = 48; todos progresaron en la terapia con anti-PD-1/PD-L1 previa) fue de 14 semanas (intervalo, 4,1–41 semanas). La respuesta por la evaluación del investigador se muestra en la figura 7. La tasa de respuesta total (ORR) fue de 13 % y 6 pacientes tuvieron PR (2 de los cuales tuvieron PD como la mejor respuesta a la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa). 15 pacientes tuvieron una reducción en la carga del tumor desde la línea base;

se observó una reducción > 30 % en 7 pacientes (figura 8). Como se muestra en la figura 8, la expresión de LAG-3 enriquece la respuesta. La figura 9 muestra la profundidad y la duración de la respuesta de los pacientes con LAG-3 $\geq 1\%$, LAG-3 < 1 %, y LAG-3 desconocido.

- 5 La figura 10 muestra la duración de la supervivencia libre de progresión. De los 48 pacientes evaluables, el 46 % (22/48) de los pacientes permanecieron en tratamiento sin progresión en el corte de datos.

Como se muestra en la figura 11, hubo un aumento de casi 3 veces en ORR para los pacientes con una expresión de LAG-3 $\geq 1\%$ (20 %) contra una expresión de LAG-3 < 1 % (7,1 %). La expresión de PD-L1 no parece enriquecer la respuesta.

10 Los resultados actualizados del ensayo clínico se muestran en las figuras 16-23. A partir de agosto de 2017, se trataron 262 pacientes, incluyendo 68 pacientes con melanoma que progresaron en la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa (mel previo a IO). Las características demográficas actualizadas de la línea base y las características de la enfermedad se muestran en la figura 17. De la cohorte de mel previo a IO, el 68 % de los pacientes tuvieron una enfermedad de M1C sin metástasis cerebral, el 13 % tuvo lactato deshidrogenasa (LDH) ≥ 2 veces al límite superior normal (ULN), y el 25 % tuvo metástasis hepática.

15 La figura 18 muestra el historial de tratamiento previo actualizado de la cohorte de mel previo a IO. De los 68 pacientes, el 77 % tuvo ≥ 2 terapias previas; el 46 % de los pacientes tuvo una enfermedad progresiva (PD) como la mejor respuesta a la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa. La mayoría de los pacientes (57 %) también recibieron una terapia con anti-CTLA-4 previa. El 46 % de los pacientes tuvieron una mejor respuesta de PD a la terapia con anti-PD1/PD-L1 previa.

20 La figura 19 muestra los datos actualizados de la eficacia para la cohorte de mel previo a IO. ORR fue de 11,5 % y DCR fue de 49 %. La expresión de LAG-3 ($\geq 1\%$) parece enriquecer la respuesta. No se alcanzó la duración promedio de la respuesta (intervalo, 0,1+-39,3+).

25 La figura 20 muestra la respuesta por las características de la línea base y la expresión de LAG-3 observada en la cohorte de mel previo a IO. La expresión de LAG-3 ($\geq 1\%$) enriqueció la respuesta independientemente de la expresión de PD-L1.

30 Las figuras 21 y 22 muestran el mejor cambio en el tamaño de la lesión objetivo por la expresión de LAG-3 y de PD-L1 y la profundidad y duración de la respuesta por la expresión de LAG-3 y de PD-L1, respectivamente, observados en la cohorte de mel previo a IO. Las respuestas fueron más probables en los pacientes con una expresión de LAG-3 $\geq 1\%$. La expresión de PD-L1 no parece enriquecer la respuesta.

35 La figura 23 muestra la duración de la supervivencia libre de progresión. De los 61 pacientes evaluables, el 34 % (21/61) de los pacientes no tuvieron progreso en el corte de datos. De los 33 pacientes con LAG-3 $\geq 1\%$ evaluables, el 55 % (18/33) de los pacientes no tuvieron progreso en el corte de datos. De los 20 pacientes con LAG-3 < 1 % evaluables, el 5 % (1/20) de los pacientes no tuvieron progreso en el corte de datos.

EJEMPLO 3

40 Eficacia preliminar y enriquecimiento del biomarcador en varios tumores sólidos avanzados en un estudio de fase 1/2a de una combinación de un anticuerpo monoclonal de anti-LAG-3 y de anti-PD-1

45 El LAG-3 es un receptor de transmembrana que regula negativamente la activación de las células T. La señalización a través de LAG-3 y otros receptores inhibidores de las células T, incluyendo la muerte programada 1 (PD-1), puede conducir al agotamiento de las células T y es un mecanismo de escape inmunológico para los tumores. El bloqueo simultáneo de LAG-3 y de PD-1 puede funcionar sinergísticamente para restaurar la activación de las células T y mejorar la inmunidad antitumoral. En un estudio de fase 1/2a, BMS-986016 (mAb de IgG4 que tiene como objetivo el LAG-3) \pm nivolumab (mAb de IgG4 que tiene como objetivo la PD-1) demostraron tolerabilidad, activación de las células T periféricas y una actividad clínica preliminar (NCT01968109; Lipson *et al.* J Immunother Cancer. 2016;4(suppl):173 [resumen P232]). La eficacia de BMS-986016 + nivolumab en varias cohortes de expansión del tumor sólido avanzado se evaluó tanto en poblaciones enriquecidas con biomarcadores como en poblaciones de todos los rincones.

50 Todos los pacientes (n = 204 a partir del 7 de abril de 2017) fueron tratados con 80 mg de BMS-986016 + 240 mg de nivolumab Q2W en ciclos de 56 días hasta la progresión de la enfermedad, respuesta completa confirmada, finalización de 12 ciclos, o toxicidad prohibitiva. La mayoría de las cohortes se centraron en los pacientes sin tratamiento previo inmunoncoológico con progresión durante/después de al menos 1 terapia previa diferente e incluyeron pacientes con cáncer de la unión gástrica/gastroesofágica avanzado, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, carcinoma de las células renales, y NSCLC. Otra cohorte incluyó pacientes con NSCLC que progresaron durante/después de anti-PD-1/PD-L1 previo como su terapia más reciente. 55 Los subconjuntos de pacientes definidos por biomarcadores se describieron con base en la evaluación inmunohistoquímica de PD-L1 y de LAG-3 en las biopsias del tumor.

La figura 12 muestra el estado de la expresión de LAG-3 de las muestras del tumor gástrico sin tratamiento previo inmunooncológico. El 48 % (10/21) de las muestras se evaluaron como positivas a LAG-3 usando un corte $\geq 1\%$ en un ensayo de IHC monoplex.

5 La figura 13 muestra el cambio en el tamaño de la lesión objetivo en los pacientes con cáncer gástrico sin tratamiento previo inmunooncológico en respuesta al tratamiento con una combinación de anticuerpos de anti-LAG-3 y de anti-PD-1. Los tumores positivos a LAG-3 se enriquecieron entre los pacientes que respondieron al tratamiento. La respuesta del tumor se determinó de acuerdo con RECIST. El grupo de pacientes mostrado no han sido expuestos 10 previamente al tratamiento con anti-PD-1/PD-L1.

La figura 14 muestra el estado de la expresión de LAG-3 de las muestras del tumor de SCCHN, carcinoma renal, HCC, y NSCLC sin tratamiento previo inmunooncológico, como se determinó por medio de un ensayo de IHC monoplex.

15 EJEMPLO 4

Perfilación multitumoral de LAG-3 y asociación con los fenotipos de las células inmunológicas

20 El LAG-3 regula negativamente la activación de las células T. Sierro S *et al.* Expert Opin Ther Targets. 15:91-101 (2011); Gross JF *et al.* J Clin Invest. 117:3383-3392 (2007). Los receptores de LAG-3 y de muerte programada 1 (PD-1) se sobreexpresaron y se coexpresaron en los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL). Goding SR *et al.* J Immunol. 190:4899-4909 (2013). La sobreexpresión de LAG-3 y de PD-1 puede limitar la respuesta del tratamiento a la terapia con anti-PD-1 y puede conducir a la progresión del tumor. Ascierto P *et al.* Poster 9520 presented at the 53rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2-6 de junio del 2017; Chicago, IL; Wherry, Nat Immunol. 12(6):492-9 (2011); Woo SR *et al.* Cancer Res. 72:917-927 (2012); Huang CT *et al.* Immunity. 21:503-513 (2004). 25 BMS-986016 es un anticuerpo de IgG4 completamente humano que tiene como objetivo el LAG-3, que bloquea la unión a su ligando, el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) (figura 24). Huard B *et al.* Proc Natl Acad Sci EUA. 94:5744-5749 (1997). BMS-986016 combinado con nivolumab (anti-PD-1) pueden restaurar la activación de las células T y la respuesta del tumor en los pacientes cuya enfermedad progresó con la monoterapia 30 con anti-PD-1. Ascierto P *et al.* Poster 9520 presented at the 53rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2-6 de junio del 2017; Chicago, IL. Esta doble inhibición también puede mejorar la durabilidad de la respuesta en los pacientes no tratados previamente con una terapia con anti-PD-1. El bloqueo simultáneo de LAG-3 y de PD-1 por BMS-986016 y nivolumab, respectivamente, produjo la activación de las células T periféricas y mostró una actividad clínica y una seguridad que se puede manejar en los pacientes con tumores sólidos avanzados. Ascierto 35 P *et al.* Poster 9520 presented at the 53rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2-6 de junio del 2017; Chicago, IL; Lipson E *et al.* J Immunother Cancer. 4(suppl 1):173 (2016). Para comprender mejor la asociación entre el LAG-3 y los marcadores de resistencia a través de los tumores, se ha llevado a cabo una perfilación comprehensiva de las muestras del tumor de origen comercial para investigar y caracterizar la expresión de LAG-3 y de MHC II en el contexto de los biomarcadores inflamatorios.

40 Métodos

45 **Inmunohistoquímica cuantitativa (IHC).** Se perfilaron muestras del tumor sólido de los pacientes con carcinoma de las células renales (RCC), carcinoma gástrico, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello (SCCHN), y carcinoma urotelial. Las secciones del portaobjetos se tiñeron por IHC para LAG-3, CD8, FOXP3, CD68, CD163, PD-L1, y MHC II usando las plataformas de Leica Bond Rx o de Dako Link 48. Para los marcadores de las células inmunológicas (LAG-3, CD8, FOXP3, CD68, CD163), la positividad porcentual se determinó usando el software de análisis de imágenes de Aperio por medio de la definición de la proporción de las células nucleadas totales que expresan el biomarcador en el microambiente del tumor. La expresión de MHC II y de PD-L1 por IHC en las células del tumor se evaluó manualmente. La agrupación no supervisada (método de Ward) se llevó a cabo en los datos de IHC para identificar las asociaciones entre LAG-3 y otros biomarcadores inmunológicos. Para determinar la colocalización de MHC II+ y de LAG-3+, se evaluaron las regiones de las células del tumor de alto MHC II ($> 70\%$ de MHC II+) o de bajo MHC II ($< 10\%$ de MHC II+) para el 50 número de células teñidas con LAG-3 (promedio de tres campos de visión de 20x cada uno para las regiones positivas y negativas).

55 **60 Análisis de ARNm.** En los pacientes con RCC y melanoma, los cambios en los niveles de ARNm de LAG-3 se determinaron por medio de los análisis de expresión génica diferencial de Affymetrix (RCC) o los datos de la secuenciación de ARN (melanoma) de las muestras de la biopsia del tumor recolectadas en la selección y 2-4 semanas después del inicio de la inmunoterapia.

65 **66 Análisis estadísticos.** Las correlaciones entre la expresión de LAG-3 y otros biomarcadores inmunológicos se evaluaron por medio de la correlación de Spearman, R. La prueba de Mann-Whitney se llevó a cabo para evaluar las diferencias estadísticas. Los análisis de expresión génica diferencial se llevaron a cabo usando los modelos lineales generalizados que incluyeron el grupo de tratamiento y el tiempo como factores.

Resultados

Expresión de LAG-3 en los tumores. Para las muestras del tumor analizadas en 6 tipos de tumores sólidos diferentes (n = 245: RCC, 43; gástrico, 41; NSCLC, 41; melanoma, 40; SCCHN, 40; urotelial, 40) se observó un intervalo de baja a alta expresión de LAG-3 (0,01 % a 33 % de las células nucleadas totales). La expresión de LAG-3 se puede localizar en las regiones perinucleares, de la membrana, o citoplásmicas de los linfocitos, como se muestra por medio de la tinción por IHC (figura 25).

Asociación de LAG-3 con los biomarcadores inmunológicos e inflamatorios. Se observó una correlación moderada de la expresión de LAG-3 con CD8, FOXP3, CD163, y CD68 (n = 237: RCC, 43; gástrico, 39; NSCLC, 39; melanoma, 39; SCCHN, 40; urotelial, 37) (figuras 26A–D, r = 0,49–0,65); no se observó una correlación de LAG-3 con la expresión del tumor de PD-L1 y de MHC II (figuras 26E y 26F, r = 0,28–0,30). Se observó frecuentemente la expresión de MHC II en las células del tumor ($\geq 1\%$), que variaba de una baja de 55 % (melanoma) a una alta de 82 % (carcinoma gástrico).

15 Los tumores con una expresión de MHC II $\geq 1\%$ en las células del tumor mostraron un aumento significativo en la frecuencia de los TIL de LAG-3+ (figura 27, n = 241: RCC, 43; gástrico, 40; NSCLC, 40; melanoma, 38; SCCHN, 40; urotelial, 40).

20 La agrupación no supervisada de las muestras por tipo de tumor reveló grupos de tumores con un intervalo de inflamación desde baja hasta alta en los 6 tipos de tumores analizados (ejemplos en las figuras 28A, carcinoma urotelial, n = 37; y 28B, carcinoma gástrico, n = 39).

25 La expresión tumoral de MHC II aumentada se observó con frecuencia en los tumores con alta inflamación, pero también se observó en los tumores con niveles más bajos de inflamación (ejemplo en la figura 28A, carcinoma urotelial). De estas muestras que se tiñeron positivamente para la expresión de MHC II de las células del tumor, el nivel de expresión de MHC II se correlacionó con el nivel de los TIL de LAG-3+ en algunos tipos de tumores (ejemplos en las figuras 28A y 298, carcinoma urotelial y gástrico). La mayoría de los tumores con una alta expresión de MHC II tuvieron una baja expresión de PD-L1 (figura 28C, n = 229: RCC, 43; gástrico, 39; NSCLC, 38; melanoma, 33; SCCHN, 39; urotelial, 37).

30 **Expresión de las células del tumor de MHC II heterogénea y TIL de LAG-3+.** En un subconjunto de las muestras del tumor analizadas (n = 6), se observó una expresión de las células del tumor de MHC II heterogénea, que varió desde baja (< 10 %) hasta alta (> 70 %) (figura 29A, carcinoma urotelial, n = 4; carcinoma gástrico, n = 2). En este subconjunto, se observó un aumento significativo en el número de TIL de LAG-3+ en las regiones del tumor con una alta expresión de MHC II contra una baja expresión de MHC II (figuras 29A–29C).

35 **Cambios en el nivel de ARNm de LAG-3 durante la monoterapia con anti-PD-1.** En un análisis de las muestras del tejido de pacientes con melanoma metastásico (NCT01621490/CheckMate 038) o RCC metastásico (NCT01358721/CheckMate 009), se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de LAG-3 entre la selección y las 2–4 semanas de tratamiento con nivolumab (figuras 30A–30B).

40 La expresión de LAG-3 se asoció con la inflamación celular en el microambiente del tumor, como se muestra por IHC. La expresión de las células del tumor de MHC II se observó con frecuencia en los 6 tipos de tumores analizados; la expresión de LAG-3 en las células inmunológicas se enriqueció en los tumores con una expresión de MHC II en las células del tumor. Se observó una mayor frecuencia de los TIL de LAG-3+ en las regiones del tumor positivas/de alto MHC II contra las regiones del tumor negativas/de bajo MHC II dentro de las muestras del tumor individuales, lo que aumenta la posibilidad de que la colocalización de la expresión de LAG-3 y de MHC II en las células del tumor pueda servir como un mecanismo de activación del punto de control de LAG-3 en ciertos tumores. Estos descubrimientos, y 45 la observación de que el nivolumab puede inducir la expresión de LAG-3, respaldan el uso de LAG-3 como un biomarcador predictivo para la terapia con BMS-986016 en los pacientes cuya enfermedad progresó después del tratamiento con una terapia con anti-PD-1.

Secuencias

55 SEC ID NO:1 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPSLKS
RVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFQYSDYEYNWFDPWGQGTIVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTVPSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEXTISAKGQPREFQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCIVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTFPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEC ID NO:2 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGS
GSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEC ID NO:3 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH); mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTN
SNPSLKS RVTLSLDTSKNQFSLKLR SVAADTA VYYCAF GYSDY EYNWFDPWGQGT LV
TVSS

10

SEC ID NO:4 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH); mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

caggtgcagctacagcagtggggcg caggactgttgaagc ttccggagaccctgtccctcac ctg
cgctgtctatgggggttcattcagtgattactactggaaactggatcccccagccccaggaaagg
ggctggagg tggattggggaaatcaatcatcgtggaaagcaccaactccaaaccctcccaagagt
cgagtccacccatcactagacacgtccaaagaacc aactgttccctgaagctgagg tctgtgaccgc
cgccgacacggctgtgttattactgtgcgttggatatagtgactacgag tacaactggttcgacc
cctggggccaggaaaccctggta ccgtctcc tca

15

SEC ID NO:5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL); mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGS
GSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK

20

SEC ID NO:6 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VL); mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

gaaattgtgttgcacacagtctccaggccaccctgtttgtctccaggggaaagagccaccctctc
ctgcaggccagtcagagtattagcagctactttagcttgcaccaacagaaacctggccaggctc
ccaggcttcatctatgtatgcaccaacaggccactggcatccagccagg ttcagtggcagt
gggtctggacagacttca ctccaccatcagcaggccatccagccatccagggatatttgcagt tattat
ctgtcagca gctgtagcaactggcc tca ctttggccaggggaccaacctggagatcaaa

25

SEC ID NO:7 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

DYYWN

30

SEC ID NO:8 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

EINHRGSTNSNPSLKS

35

SEC ID NO:9 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

GYSDYEYNWFDP

40

SEC ID NO:10 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

RASQSISSYLA

SEC ID NO:11 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

DASN RAT

SEC ID NO:12 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

5 QQRSNWPLT

SEC ID NO:13 Secuencia de aminoácidos de LAG-3 humano

MWEAQFLGLLFLQPLWAVPKPLQPGAEVPVVWAQEAGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQH
QPDSGPPAAAPGHPLAPGPHAAAPSSWGPRPRRTVLSVCPGGLRSGRPLQPRVQLDERGRQRG
DFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRIGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPD
RPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVL
GLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQ
AQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTIAITVTPKSFGPSLKGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQ
RSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLT
LGVLSSLLVLTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAKSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEP
EPEQL

10 SEC ID NO:14 Epítopo de LAG-3

PGHPLAPG

15 SEC ID NO:15 Epítopo de LAG-3

HPAAPSSW

20 SEC ID NO:16 Epítopo de LAG-3

PAAPSSWG

SEC ID NO:17 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

QVQLVESGGVVQPGRSILRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLFLQMNLSRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGFPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDCGEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREGQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

25 SEC ID NO:18 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGS
GSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

30 SEC ID NO:19 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH); mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

QVQLVESGGVVQPGRSILRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLFLQMNLSRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTIVTVSS

35 SEC ID NO:20 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH); mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

caggtgcagctggagtctggggaggcgtggccaggctggaggtccctgagactcgactg
taaagcgtctgaatcaccttcagaactctggcatgcactgggtccaggctccaggcaagg
ggctggagtgggtggcagttatitggatgaaagatactatgcagactcogtgaag
ggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgttctgcaaatacgaacagcctgag
agccgaggacacggctgtgttactgtgcgacaaacgacgactactgggccaggaaaccctgg
tcaccgtctccatca

SEC ID NO:21 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL); mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA
5 WQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTIDFTLTISSEPEDEFAYYYCQQSSNWPR
TFGQGT
KVEIK

SEC ID NO:22 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VL); mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

gaaaattgttgttgcacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctc
ctgcaggggccagtcagactgttagttacttagctgttgcattccaaacaggccactggcatcccagccaggctc
ccaggctcctcatctatgtatgcattccaaacaggccactggcatcccagccaggctcagtggcagt
gggtctggacagacttcacttcaccatcagcagccctagagcctgaagatttgcagtttatta
ctgtcagcagactgttgcctcgacgttccggccaaaggaccaagggtggaaatcaaa

10 SEC ID NO:23 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

NSGMH

15 SEC ID NO:24 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

VIWYDGSKRYYADSVKG

SEC ID NO:25 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

20 NDDY

SEC ID NO:26 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

25 RASQSVSSYLA

SEC ID NO:27 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

30 DASNRAT

SEC ID NO:28 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera; mAb de anti-PD-1 (BMS936558)

35 QQSSNWPR

SEC ID NO:29 Secuencia completa de Homo sapiens de PD-1

agtttcccttcgctcacctccgctgagcagtggagaaggcggcactctggtgggctgtcca
ggcatgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc
aggatggttcttagactccccagacagggccctggaaacccccccaccccttccacccctgtcg
tggtgaccgaaggggacaacgcaccccttcacctgcacgcttccaaacacatcgagagcttcgt
ctaaacttgttaccgcacatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgccttcccgaggacc
cagccagcccgccaggactgcccgttccgttgcacacaactgccaacggcggtgacttccaca
tgagcgtggtcagggccggcgaatgacagccgcacccctgttgcacgatctccctggcc
cccaaggcgccagatcaaagagagctgcgggagagctcagggtgacagagagaaggcagaagt
gcccacagccaccccaagcccteacccagggccagccggccagttccaaacccctgggttgt
tcgtggccgcctgtggcagccctgggtgtctgtctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
gcccgcacgaggacaataggagccaggcgacccggccagccctgttgcaggaggacccctcagccgt
ccctgtgtctgtggactatggggagctggatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
ccgtgcctgtgtccctgagcagacggagtatgcacccattgttgcgttgcgttgcgttgcgt
tcatccccccgcggcaggggctcagccgcacggccctggagtgcccactgaggcctgagga
tggacactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
atgagcccggtcagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
aggggctgagctgcgtggggcgaccggggctccagctgcacccattgttgcgttgcgttgcgt
acaggactcatgtctcaatgcctcagtgccatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
ggcccgatgcagtcaactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
tctctgt
tgcctgacgccccggagccctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
aagggtccccctggcagtgccatcccgaaacgcctggaaacgcaggccaggactggcacaagg
tgggaggtaatgggctggggactccctggaggttatctgttgcgttgcgttgcgttgcgt
cagggaaaggtaagagacttgcgtgtgtggcaggccaggaaacccctccacccatccac
atgcctcaggcagcaccccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
agctggaggcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
cacaccactcggagagggacatctacggccatccctgggtgtgtggagggcaggactgg
aggccctcccgactgt
catgtgccccccctggcagtgccatccctgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
gttccaccaggccctgggtggaaaggtaaggcgtttcccccggggctagttaccccggt
ctatccactcctcacatccacacactgcacccacttgcgtggccaggccaccaggcatcc
ggccagcaggcacctgagtggtggacaaggatccccccttcctgtgggttctattatattata
attataatataatgagagcatgt

SEC ID NO:30 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

ES 2 965 352 T3

SEC ID NO:31 Secuencia de nucleótidos de cadena ligera; mAb de anti-LAG-3 (BMS-986016)

gaaattgtgttacacagtctccagccaccctgtctttgtctccagggaaagagccaccctctc
ctgcagggccagtcagagtattagcagctactttagctgttaccaacagaaaacctggccaggctc
ccaggctctcatctatgtatgcaccaacaggccactggcatcccagccaggttcagtggcagt
gggtctggacagacttcacttcaccatcagcagcttaggcctgaagatttgcagttattat
ctgtcagcagcgttagcaactggctctcactttggccagggaccaacctggagatcaaacgt
cggtggctgcaccatctgtcttcatttcccgccatctgtatgagcagttgaaatctgaaactg
tctgttgtgtgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagtggataa
cgccctccaatcggttaactcccagagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcac
ccctcagcagcaccctgacgctgagaacagcagactacgagaaaacacaaagtctacgc
gtcaccatcaqqqctqagctcqcccqtcacaaaqagttcaacacqqqqaqagttaq

SEC ID NO:32 Porción

MYFPPPY

- 10 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor o un anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno en un paciente humano,
 - 5 en donde el inhibidor o el anticuerpo es un inhibidor de LAG-3 en combinación con un inhibidor de la ruta de PD-1, en donde el inhibidor de LAG-3 es un anticuerpo anti-LAG-3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y en donde el inhibidor de la ruta de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo anti-PD-L2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
 - 10 en donde se predice que el paciente responderá al tratamiento cuando una muestra del tumor maligno del paciente es positivo a LAG-3 y en donde la muestra es positiva a LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.
 - 15 2. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de la reivindicación 1, en donde la muestra es positiva a LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 4 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 7 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 % o al menos aproximadamente un 30 % de células que expresan LAG-3, en donde las células que expresan LAG-3 comprenden linfocitos infiltrantes del tumor.
 - 20 3. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de la reivindicación 1, en donde la muestra es positiva a LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 1 % de linfocitos infiltrantes del tumor que expresan LAG-3.
 - 25 4. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de la reivindicación 3, en donde la muestra es positiva a LAG-3 cuando la muestra comprende al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 4 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 7 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 100 % de linfocitos infiltrantes del tumor que expresan LAG-3.
 - 30 5. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tumor maligno es:
 - 35 (a) un cáncer de hígado, cáncer de los huesos, cáncer de páncreas, cáncer de la piel, cáncer oral, cáncer de la cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer del recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma no de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cánceres de inicio en la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de las células escamosas, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen aquellos inducidos por asbestos, neoplasias hematológicas que incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de las células B, linfoma de Hodgkin/linfoma de las células B mediastinal primario, linfomas no de Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoide crónica, linfoma folicular, linfoma de las células B grandes difusas, linfoma de Burkitt, linfoma de las células grandes inmunoblásticas, linfoma linfoblástico de las células B germinales, linfoma de las células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma de las células grandes anaplásicas, linfoma de las células T, y linfoma linfoblástico de las células T germinales, o cualquier combinación de los mismos,
 - 40 (b) melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), tumor relacionado con el virus del papiloma humano (VPH), o adenocarcinoma gástrico,
 - 45 (c) cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), un tumor relacionado con el cáncer relacionado con el virus, o adenocarcinoma gástrico,
 - 50 (d) melanoma, cáncer gástrico, cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello, o cáncer de las células renales, o
 - 55 (e) cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de las células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer gástrico, o carcinoma hepatocelular.
 - 60 6. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la muestra positiva a LAG-3 del tumor maligno es una muestra de un tumor de melanoma o un tumor de cáncer gástrico.

7. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra es positiva a PD-L1.
8. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra es negativa a PD-L1.
9. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tumor maligno es refractario al tratamiento con un inhibidor del punto de control inmunológico, un anticuerpo de anti-PD-1, un anticuerpo de anti-PD-L1 o una combinación de los mismos.
10. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo de anti-LAG-3 es un anticuerpo biespecífico.
11. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende (a) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:7; (b) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:8; (c) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:9; (d) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:10; (e) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:11; y (f) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:12.
12. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden las regiones variables de las cadenas ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:3 y 5, respectivamente.
13. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el anticuerpo de anti-LAG-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden las cadenas ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:1 y 2, respectivamente.
14. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo de anti-LAG-3 es MK-4280 (28G-10), REGN3767, IMP731 (H5L7BW), BAP050, IMP-701 (LAG-525), Sym022, TSR-033, MGD013, FS118, o GSK2831781.
15. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden (a) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:23; (b) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:24; (c) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:25; (d) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:26; (e) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:27; y (f) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO:28.
16. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden las regiones variables de las cadenas ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:19 y 21, respectivamente.
17. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el anticuerpo de anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprenden las cadenas ligera y pesada que comprenden las secuencias establecidas en las SEC ID NO:17 y 18, respectivamente.
18. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el anticuerpo de anti-PD-1 es el pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475), pidilizumab (CT-011), o nivolumab (OPDIVO; BMS-936558).
19. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el anticuerpo de anti-PD-L1 es el atezolizumab (Tecentriq o RG7446), durvalumab (Imfinzi o MEDI4736), avelumab (Bavencio) o BMS-936559.
20. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o 15 a 18, que comprenden las siguientes dosis: (a) 3 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 80 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (b) 3 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (c) 20 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (d) 80 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 160 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (e) 80 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1; (f) 160 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1, o (g) 240 mg del anticuerpo de anti-LAG-3 y 240 mg del anticuerpo de anti-PD-1.

21. El inhibidor o el anticuerpo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 15 a 18 o 20, que comprenden anticuerpos de anti-PD-1 y de anti-LAG-3 o los fragmentos de unión a los antígenos de los mismos formulados para la administración intravenosa y/o son formulados conjuntamente o por separado.

Figura 1

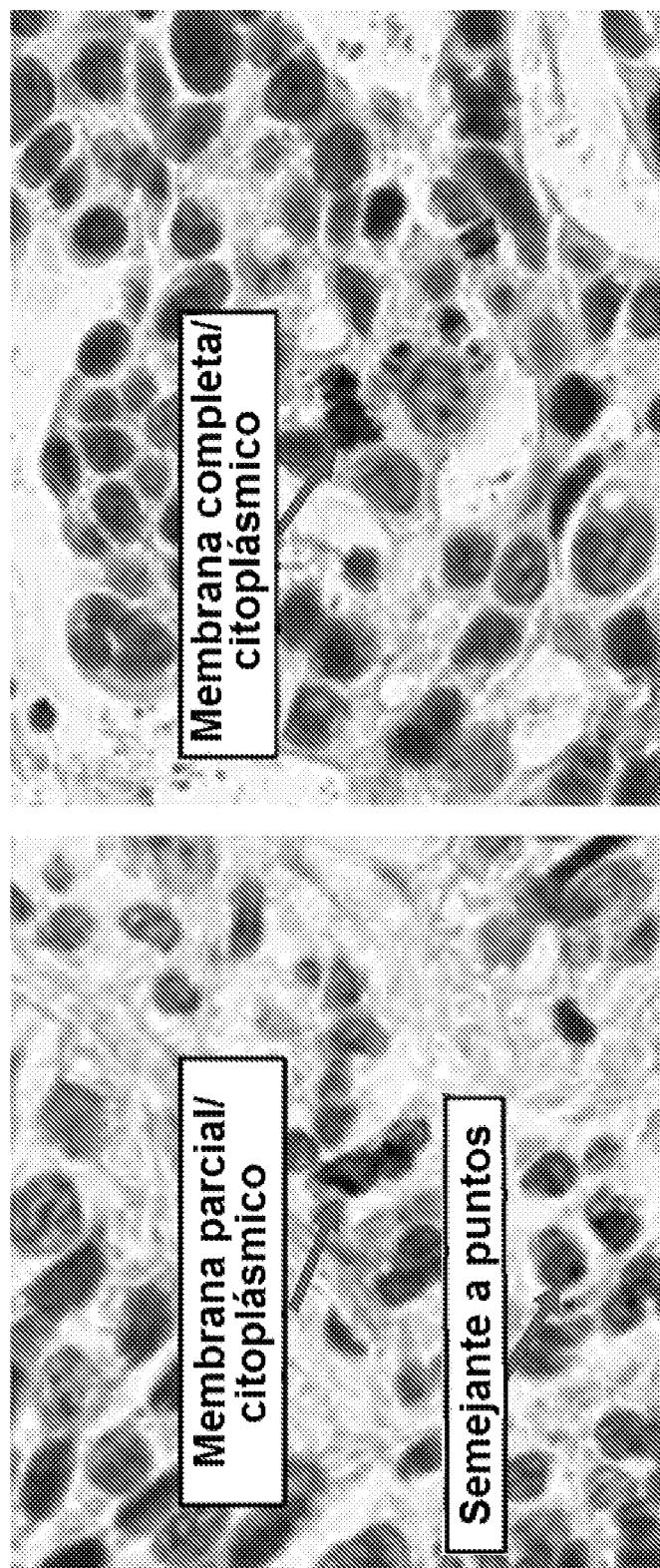


Figura 2

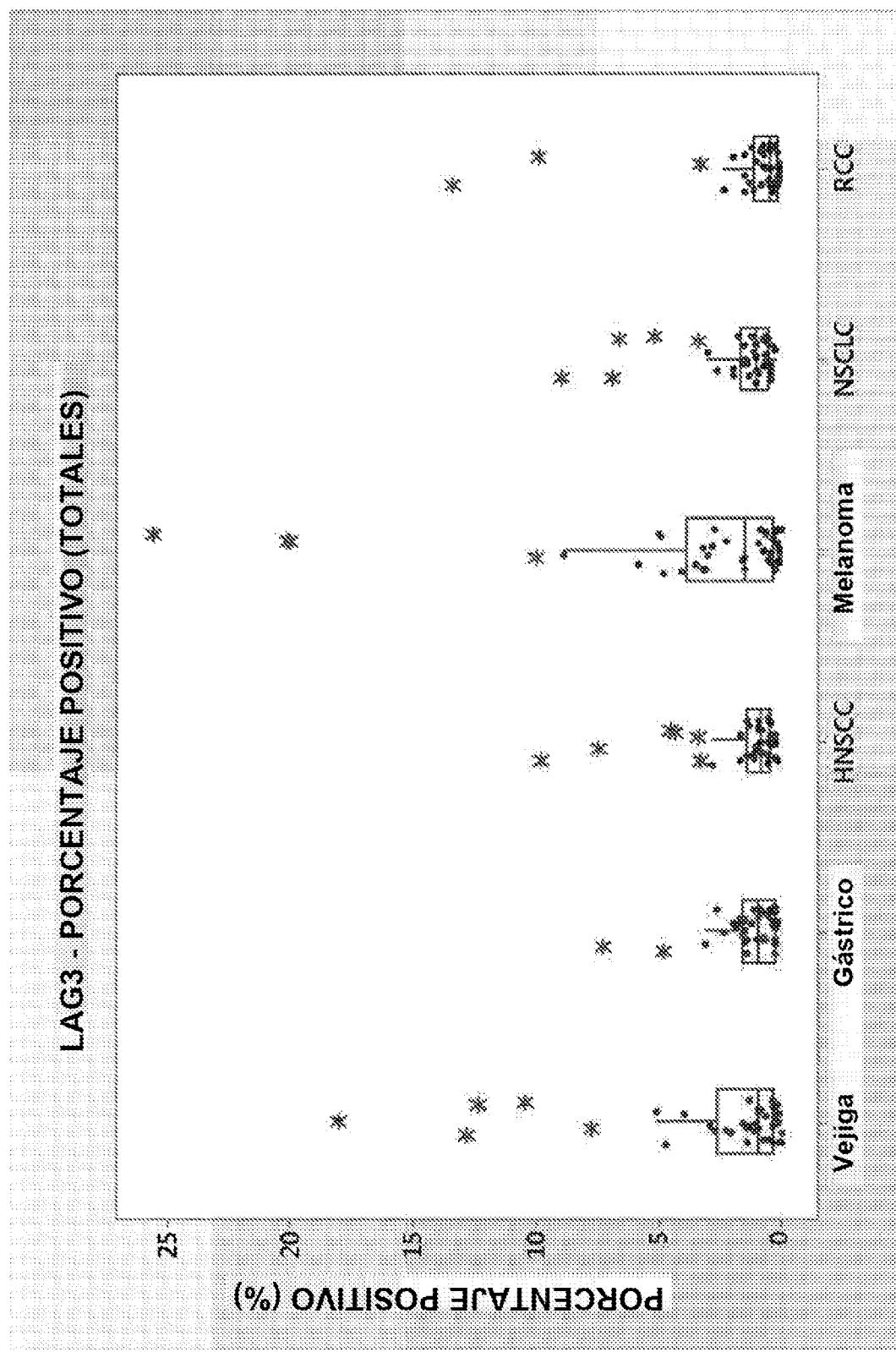


Figura 3A



Propagación del tumor evaluada por los criterios de la evaluación de la respuesta en los tumores sólidos (RECIST) y la evaluación del investigador. Seguimiento individualizado de los pacientes de LGC-3 y de PC-L1 con respecto a la información: expresión de los genes codificantes de los marcadores tumorales y expresión de los genes codificantes de los marcadores tumorales en varones, mujeres y normales. Evaluación de LGC-3 en los círculos mamarios y expresión de PC-L1 en los círculos del tumor ($n = 6$); determinación de los genes de Ducto 38-PC-L1 ($n = 6$).

Figure 3B

Criterios de elegibilidad para pacientes en la cohorte de melanoma Prior-IO expansión

Inclusión	Exclusión
Al menos 18 años de edad y ECOG PS ≤ 1	Expresión previa a LO diferentes de la terapia con un anticuerpo de anti-CTLA-4 y/o de anti- PD-1 y/o anti- CD-137 (por ejemplo, anti- CD-137 anti- CD-137 y anti- CD-137)
Metástasis avanzado (metastásico y/o no resecable)	Metástasis cerebral no controlada
Progressión enfermedad de ≥ 1 y ≤ 3 regímenes estándares previos	Enfermedad inmunológica activa
Tratamiento previo con anti- PD-1 y/o anti- CD-137 y/o anti- CTLA-4 + BEAF + MEK1 requeridos	
Terapia auxiliar o neoadyuvante previa con ciclogemas (L-3 o L-6) o anticuerpos de anti-CTLA-4 permitidas	
	Al menos 1 lesión que se puede medir por RECIST v1.1 o

Figura 4

1 tabla 1. Características demográficas y de la enfermedad de la línea base

		Todos pacientes (n = 65)
		% (n)
Edad promedio (intervalo), años		
< 65 años, n (%)	38 (58)	
Hombres, n (%)	58 (89)	
Raza, n (%)	38 (58)	
Blanca	32 (49)	
Negra	10 (16)	
Asiática	1 (2)	
Otra	1 (2)	
Estado, %, n (%)		
0	38 (58)	
1	27 (42)	
Estado de la actividad del estudio, n (%)		
MG	7 (11)	
MIA	6 (11)	
MIB	4 (7)	
MIC con metástasis cerebrales	1 (2)	
MIC sin metástasis cerebrales	2 (3)	
UICC, n (%)		
I	26 (40)	
II	12 (20)	
IIIa < 2 x 18%	8 (13)	
> 2 x 18%	8 (13)	
Desconocido	8 (13)	
Metástasis en el higado, n (%)		
Si	11 (20)	
No	44 (68)	
Estado de BRF, n (%)		
Mutación	21 (32)	
Sin mutación	31 (48)	
Desconocido	13 (20)	

a. metástasis.

Figure 5

Tabla 2. Terapia previa

Variables (n=10)	Mejor respuesta (n=5)	Mejor respuesta (n=5)
Radiotherapy pre-OP	16.02%	16.02%
Treatment stability at pre-OP	64.00%	64.00%
Reoperation	64.00%	64.00%
Reoperation & R	32.00%	32.00%
Anti-EGFR-LTP		
Mejor respuesta a anti-EGFR-LTP pre-OP		
0%	10.0%	10.0%
3%	12.0%	12.0%
9%	16.0%	16.0%
93%	22.4%	22.4%
Radiotherapy vs EGFR		
Radiotherapy vs MEK		
Número de regímenes sistémicos		
1	12.00	12.00
2	17.00	17.00
3	25.00	25.00
Mediana (intervalo)	2 (1-6)	2 (1-6)

Figura 6

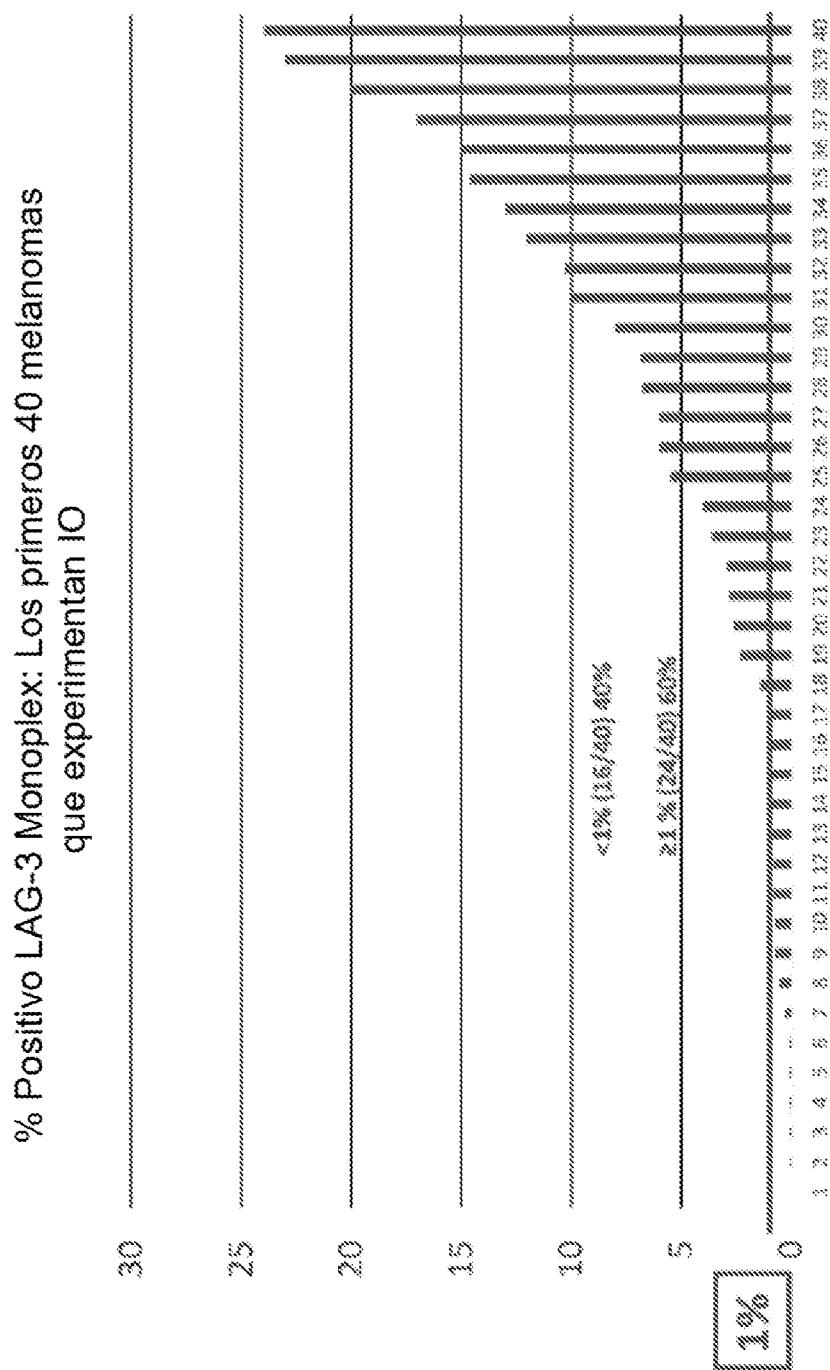


Figura 7

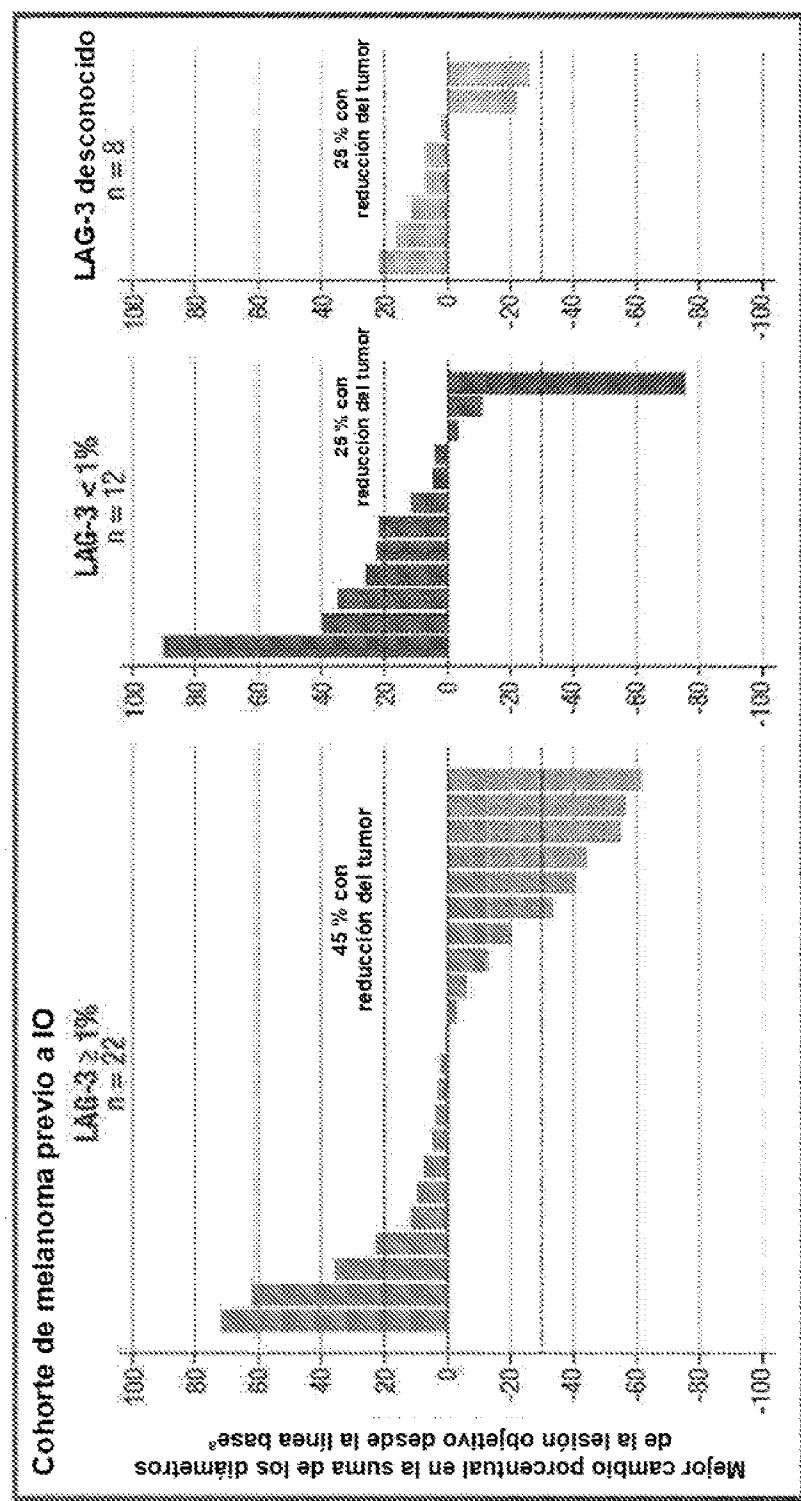
Tabla 3. Evidencia preliminar de actividad antitumoral

Pacientes n (%)	Met. previa a fe (n = 18)	
	0	1 (1)
BOA	0	0 (0)
CG	0	0 (0)
PP	0	0 (0)
SD	0	0 (0)
PD	0	0 (0)
Progrestones clínicas*	0	0 (0)
CGA, 45% CG	0 (0)	4 (22)
Lag 3 2 1% (n = 25)	0 (0)	2 (8), 0, 4
14G 3 < 1% (n = 14)	1 (7)	0, 2, 34
BOB (34 + 18 + 33)	0 (0)	28 (54)
Lag 3 2 1% (n = 25)	16 (64)	16 (64)
14G 3 < 1% (n = 14)	5 (36)	5 (36)

BOA, mejor respuesta total; CG, mejor respuesta parcial; SD, sin cambios; PD, progresión; CGA, 45% de respuesta parcial; 33% de respuesta parcial y 22% de respuesta completa; 18% de respuesta completa y 33% de respuesta parcial.

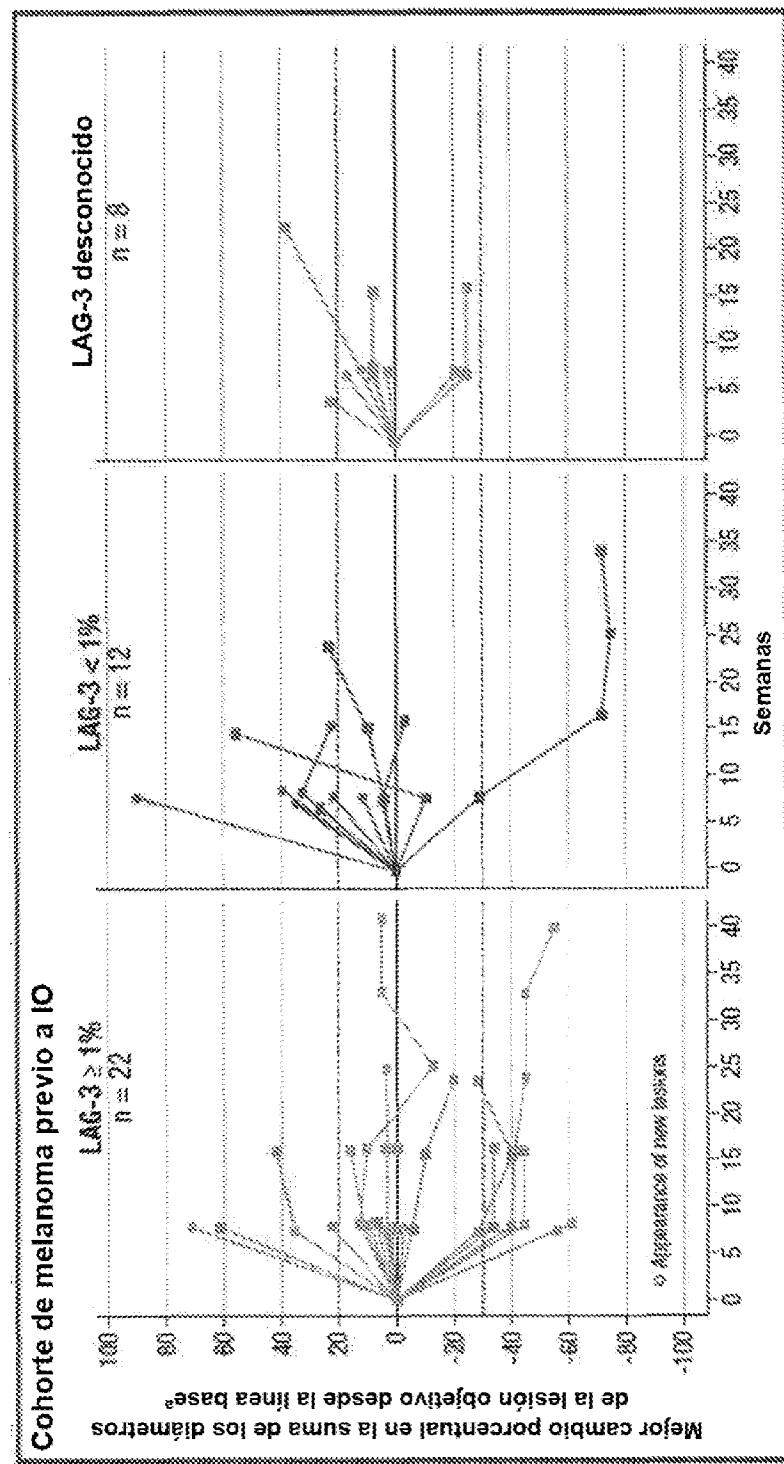
*268 respuestas no fueron clasificadas; 220 no se pudieron evaluar dentro de las categorías.

Figura 8



^aSeis pacientes tuvieron progresión clínica antes de su primera exploración y no se incluyeron en la gráfica. Un paciente con un mejor cambio desde la línea base < 30 % tuvo una mejor respuesta no confirmada de SD.

Figura 9



*Seis pacientes tuvieron progresión clínica antes de su primera exploración y no se incluyeron en la gráfica.

Figura 10

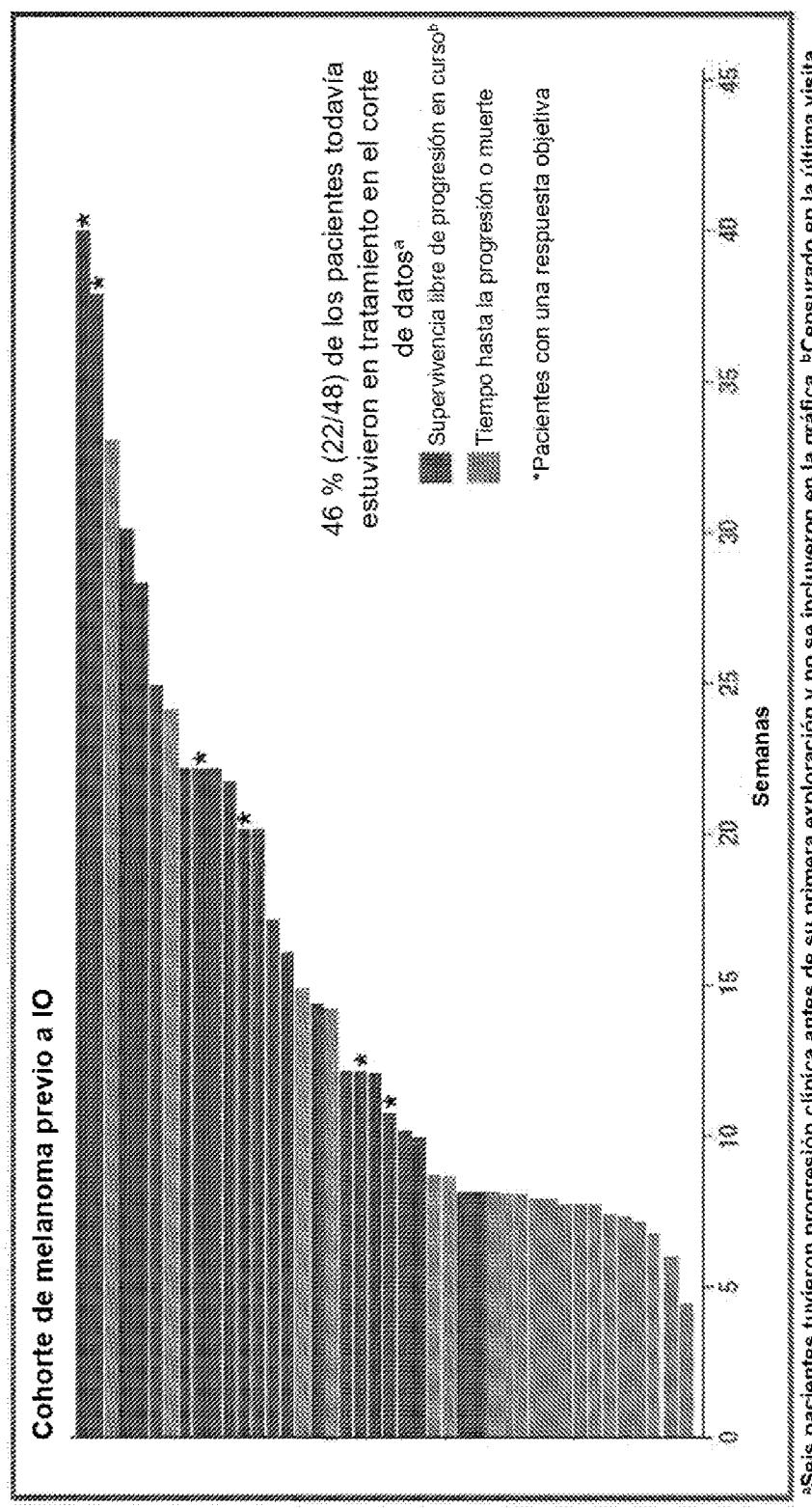


Figura 11

Tabla 4. Respuesta por las características de la línea base (investigador evaluado)

		Medición en año 10 = 483	
		100%	100%
Expresión de LAG-3			
≥ 1%	35	5 (10)	6 (12)
< 1%	14	1 (1,2)	0 (0)
Expresión de PDL1			
≥ 1%	16	2 (12)	16 (32)
< 1%	13	4 (21)	8 (16)
Respueta basada en BCR previo para anti-PD-1/PDL1 solamente			
0%	1	0	0
1%	12	2 (12)	0 (0)
2%	14	1 (6,3)	0 (0)
3% + 4% + 5%	27	3 (31)	24 (48)
5%	33	2 (30)	12 (24)
Estado de BCR al inicio del estudio			
WIA	8	1 (12)	0 (0)
WIB	3	0	0 (0)
WIC con metástasis cerebelar	1	0	0 (0)
WIC sin metástasis cerebelar	32	4 (12)	36 (72)
Metástasis en el hígado			
Sí	17	1 (8,3)	0 (0)
No	37	5 (14)	45 (90)
Estado de BRAF			
Mutación	18	0	0 (0)
Sin mutación	33	6 (21)	23 (69)

*Todas las variables que se presentan en este cuadro tienen valores presentados en la sección con este PC-INFO-129698.

Figura 12

Tinción LAG-3 gástrico primeros 21 sujetos

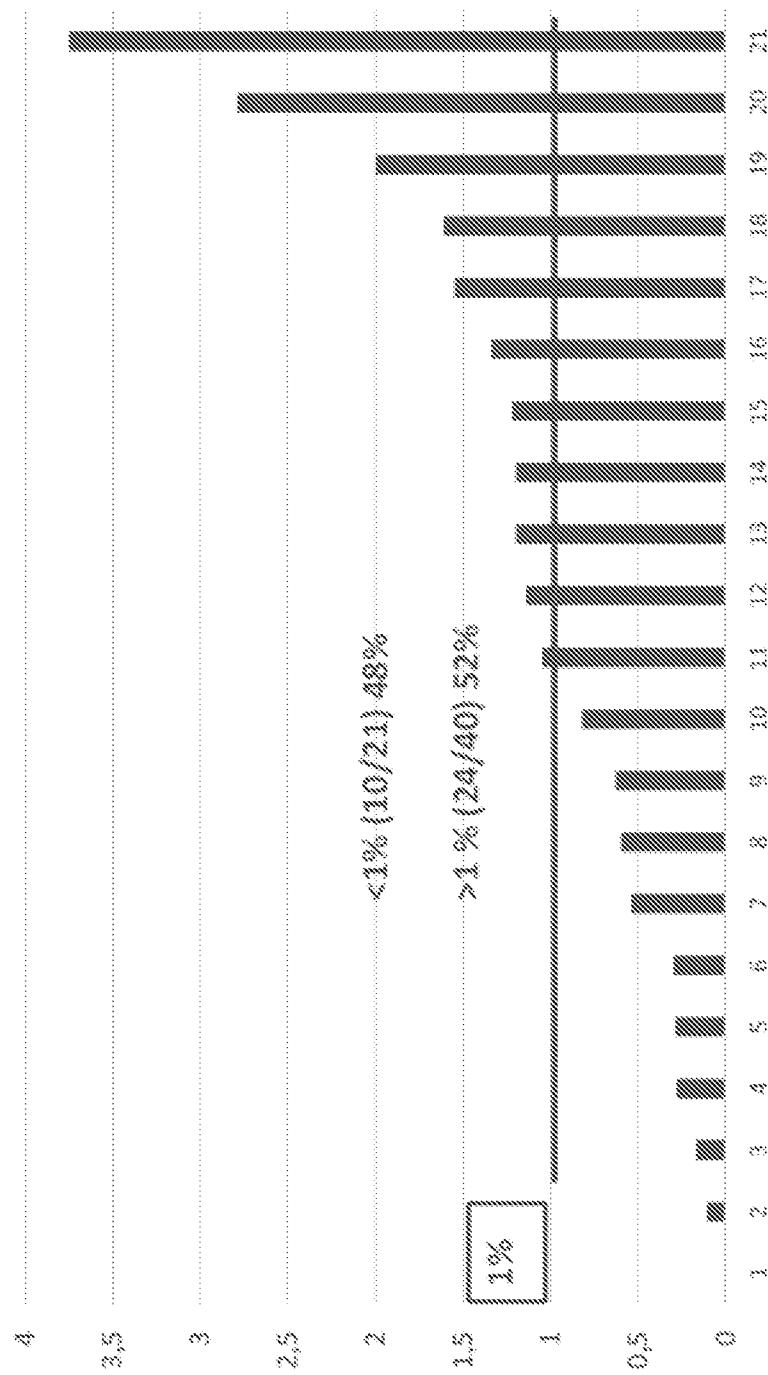


Figura 13

Actividad clínica preliminar de LAG3 + nivo
en pacientes gástricos sin tratamiento previo IO
enriquecido en pacientes LAG+

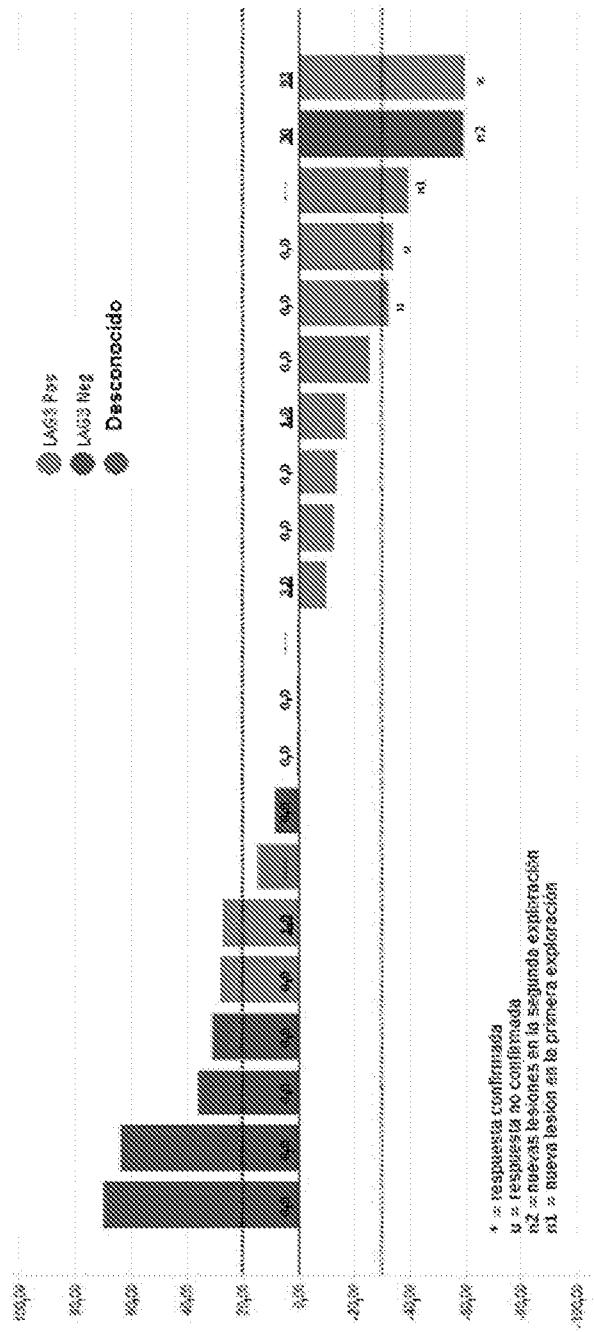


Figura 14

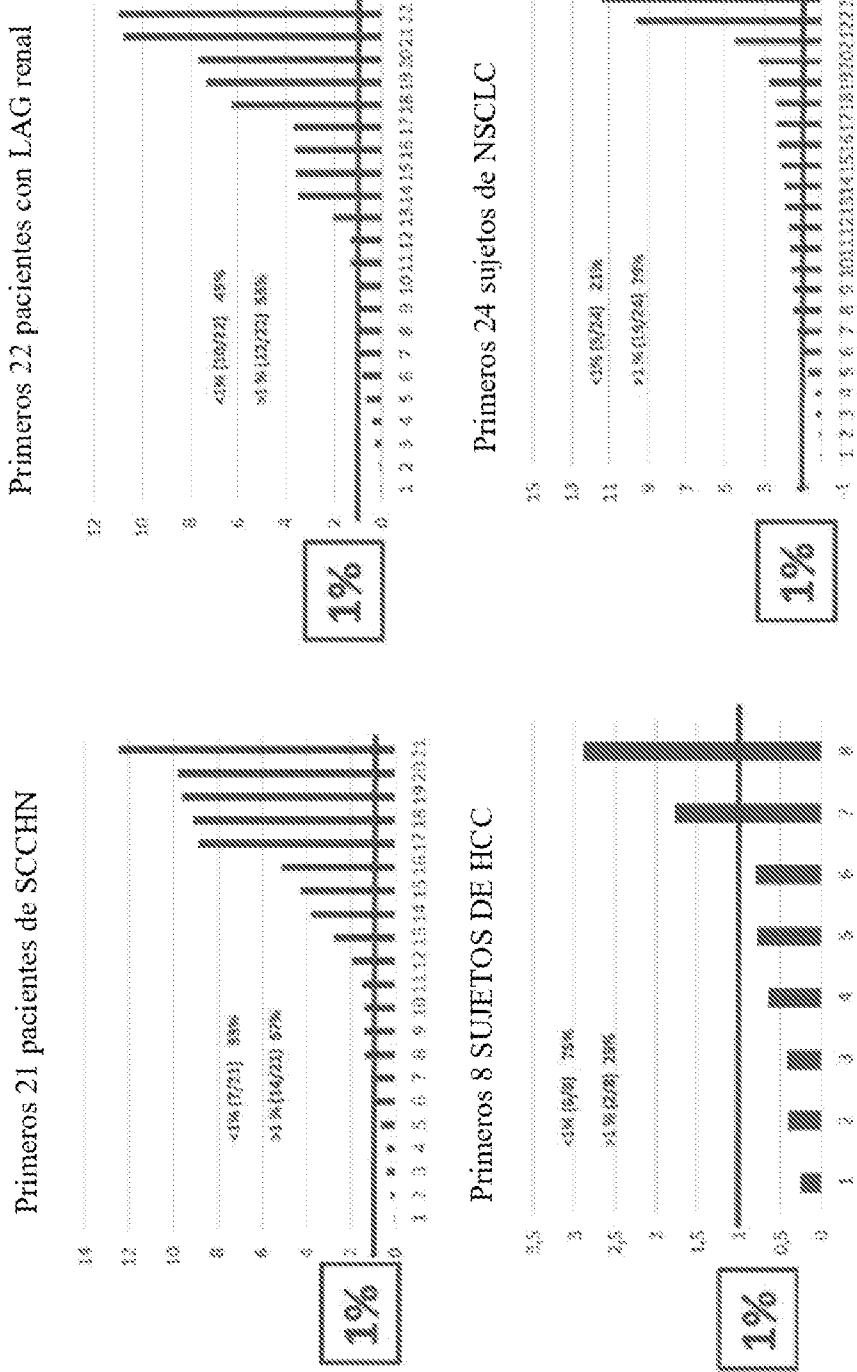
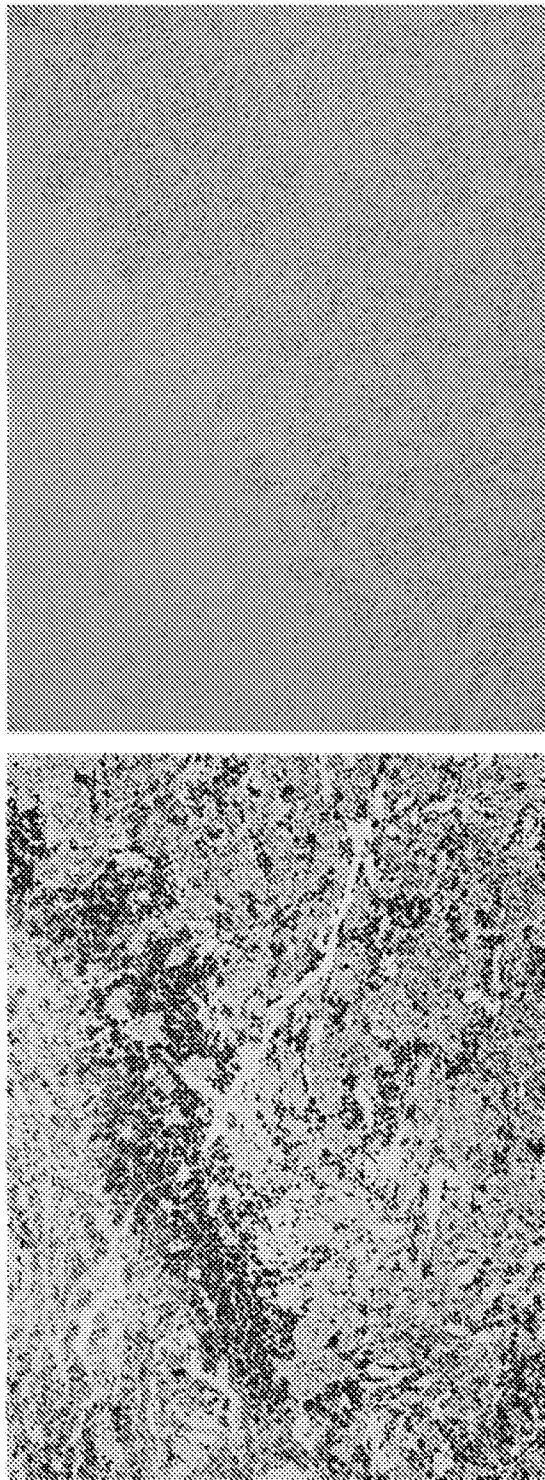


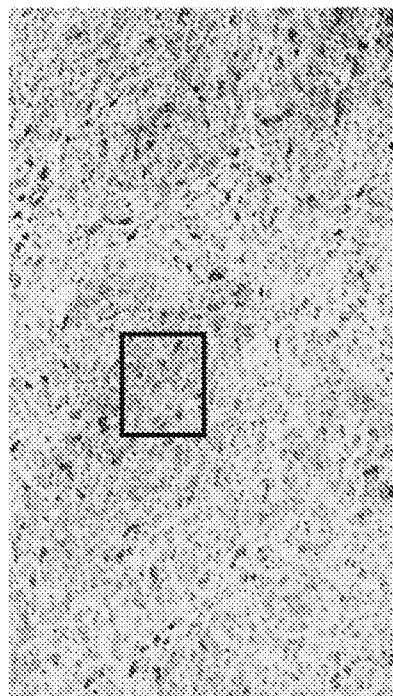
Figura 15A



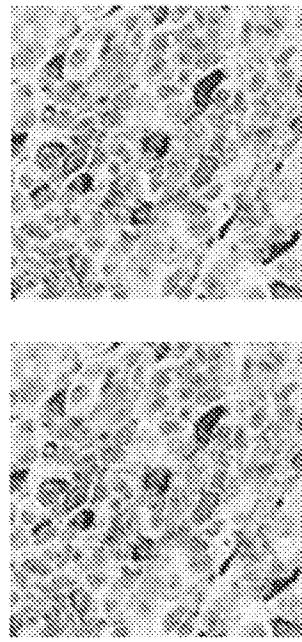
Melanoma pigmentado después del blanqueamiento
(núcleos contrateñidos con hematoxilina)

Melanoma pigmentado sin blanqueamiento
(núcleos contrateñidos con hematoxilina)

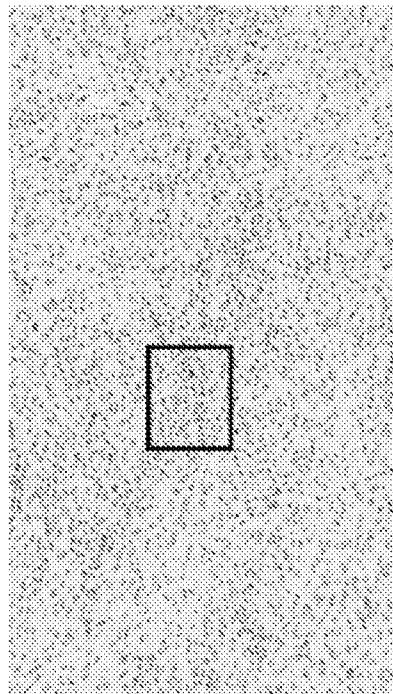
Figura 15B



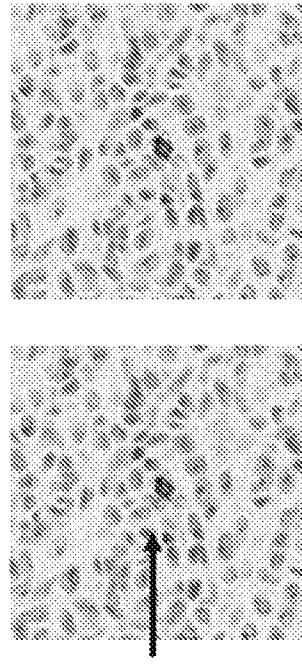
Melanoma pigmentado - LAG-3 por IHC
sin blanqueamiento
(núcleos contrateñidos con hematoxilina)



IHC de LAG-3 indistinguible de la melanina



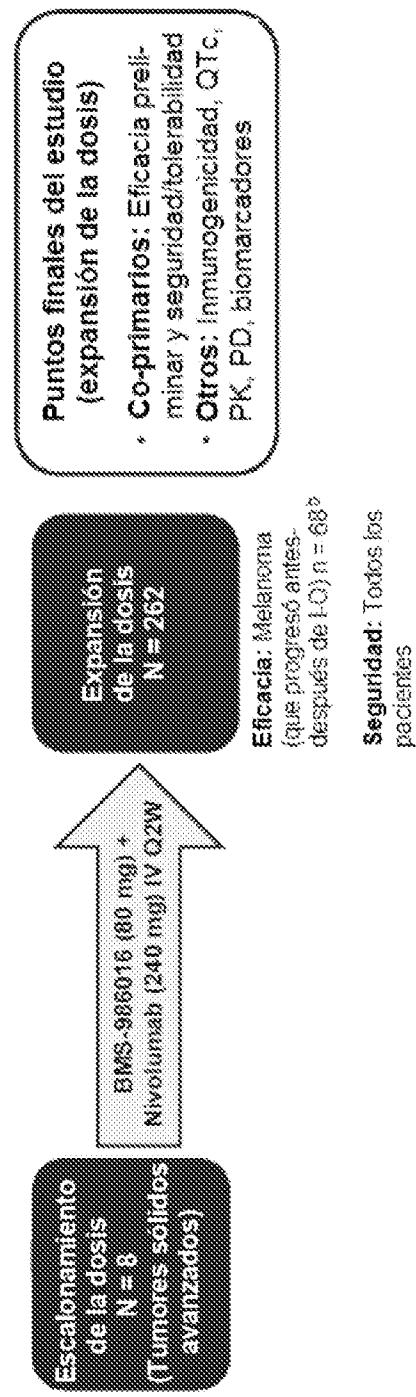
Melanoma pigmentado - LAG-3 por IHC después
del blanqueamiento
(núcleos contrateñidos con hematoxilina)



IHC de LAG-3 después del blanqueamiento

Melanoma pigmentado - LAG-3 por IHC
después del blanqueamiento
(núcleos contrateñidos con hematoxilina)

Figura 16 Razón fundamental y diseño del estudio



• Sesenta y un pacientes fueron evaluables para la respuesta.

Figura 17 Características demográficas de la línea base y de la enfermedad

	Mal prevo n = 201 (1) n = 38	Mal prevo n = 20 (1) n = 68
Edad promedio (intervalo), años	60 (25–81)	LDH, n (%)
<65 años, n (%)	44 (63)	Normal 35 (51)
Hombres, n (%)	46 (68)	Normal a < 2 x U.L.N. 15 (22)
Raza, n (%)		≥ 2 x U.L.N. 9 (13)
Blanca	85 (98)	Desconocido 9 (13)
Otra	3 (4,4)	
ECOG PS, n (%)		Metástasis en el hígado, n (%)
0	44 (63)	Si 51 (75)
1	24 (36)	No 17 (25)
Estado de R3 al inicio del estudio, n (%)		
M0	6 (8,8)	Estado de BRAF, n (%)
M1A	7 (10)	Sin mutación 43 (63)
M1B	8 (12)	Mutación 23 (34)
M1C con metástasis cerebral	1 (1,5)	Desconocido 2 (2,9)
M1C sin metástasis cerebral	46 (68)	

ECOG PS, Estado de funcionamiento del Grupo de Oncología Cooperativa del Eje. LDH, lactato deshidrogenasa. M, metástasis. Mal prevo a PD (1), pacientes con melanoma que progresaron durante la terapia con anti-PD-1/PD-L1 prevo. U.L.N., límite superior del normal.

Figura 18
Terapias previas

	Terapias previas	n (%)
Radioterapia previa, n (%)		19 (23)
Terapia sistémica previa, n (%)		68 (80)
Immunoterapia		68 (80)
Anti-CTLA-4		39 (57)
Anti-PD-1/CD137		88 (100)
Mejor respuesta a anti-PD-1/CD137 previo		
CR		1 (1,5)
PR		12 (18)
SD		20 (29)
PD		31 (46)
Inhibidores de BRAF		19 (28)
Inhibidores de MEK		13 (19)
Número de regímenes sistémicos		
1		16 (24)
2		21 (31)
≥3		31 (46)
Mejor respuesta		2 (1-5)

CR, respuesta completa; CTLA-4, antígeno 4 del linfocito T citotóxico; PD, enfermedad progresiva; PR, respuesta parcial; SD, enfermedad estable. aCuatro pacientes recibieron anti-PD-1/CD137 + anti-CTLA-4; 8 pacientes recibieron anti-CTLA-4 antes de anti-PD-1/CD137, y 33 pacientes recibieron anti-PD-1/CD137 antes de anti-CTLA-4. La terapia con anti-CTLA-4 previa no fue informada en 2 pacientes. Treinta y tres pacientes recibieron nivolumab, 32 pacientes recibieron pembrolizumab, y 2 pacientes recibieron otras terapias. Se informó que la respuesta en 1 paciente no es aplicable.

Figura 19

Actividad antitumoral de BMS-986016 + Nivolumab

BMS-986016 + Nivolumab		
ORR, n (%)	7 (11,5) ^a 4,7, 22	6 (18) ^a 7, 36
BOR, n (%)		
CR	1 (1,6)	1 (3,0)
PR	6 (9,8) ^a	5 (15) ^a
SD	23 (36)	15 (45)
PD	25 (41)	8 (24)
Progresión clínica ^a	6 (9,8)	4 (12)
DCR (CR + PR + SD), n (%)	30 (49)	21 (64)
95% CI	36, 62	45, 80

BOR, mejor respuesta total.

✓pacientes que se pueden evaluar para la respuesta: todos progresaron durante la terapia con anti-*PD-1*PD-L1 mabe. ^aExpresión de LAG-3 en las células tumorales (porcentaje de las células positivas dentro del margen invasivo, tumor, y estroma) evaluada por ¹⁸F-C en las secciones del tumor con un clín del anticuerpo 1784. ^aRespuesta del tumor evaluada por el investigador por los criterios de evaluación de la respuesta en los tumores sólidos v1.1. Una respuesta no fue confirmada. *Ocurrió antes de la primera exploración radiográfica.

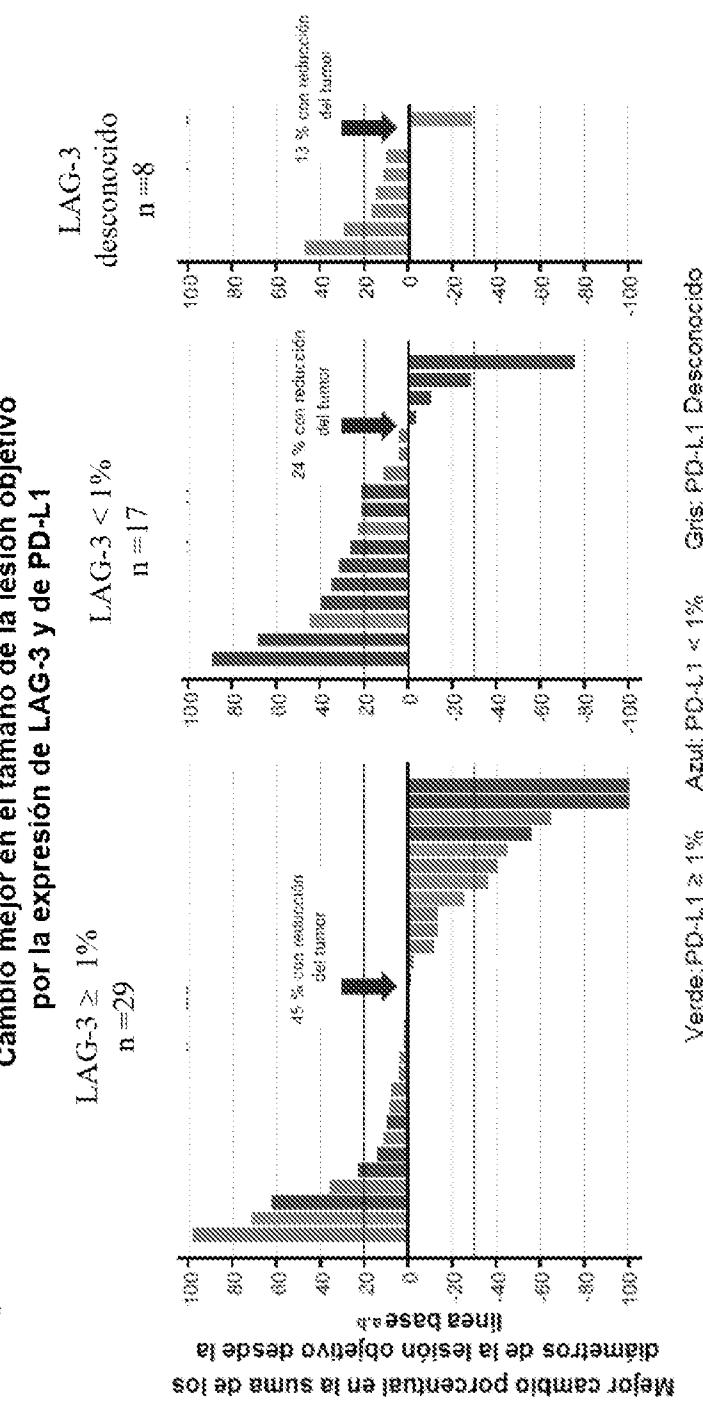
Figura 20 Resuesta por las características de la línea base y la expresión de LAG-3

	Positivo	Negativo	Total
Expresión de PD-L1 (N = 44)			
> 1%	18	1 (2,3)	4
< 1%	11	3 (27)	13
Estado de BRAF (N = 52)			
Sin mutación	21	5 (24)	26
Mutación	11	1 (9,1)	12
Anti-CTLA-4 Previo (N = 53)			
No	12	1 (8,3)	13
Sí	21	5 (24)	26

✓Todos los pacientes que se quedan en vias para la respuesta, todos progresaron durante la terapia con anti-PD-L1 y se presta.

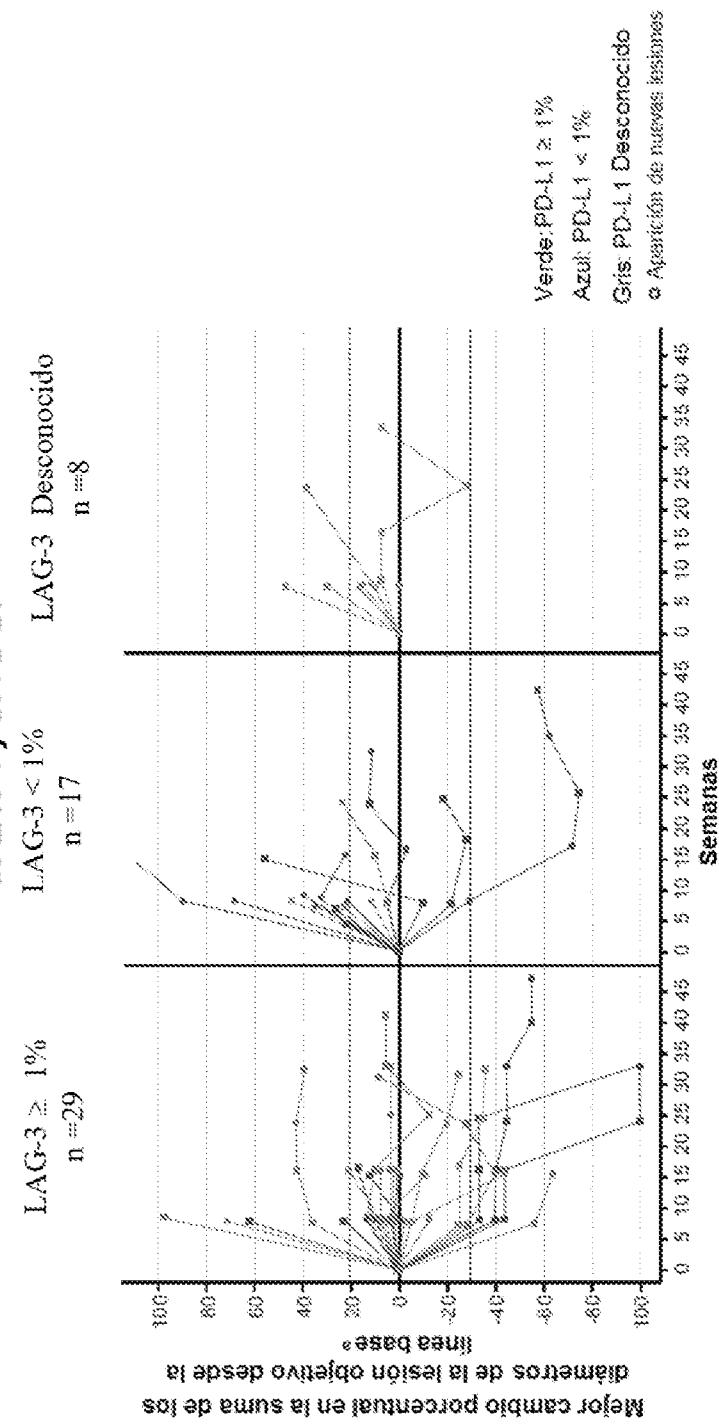
✓La expresión de PD-L1 en las células del tumor (porcentaje de las células positivas dentro del margen invasivo, tumor, y estroma) evaluada por IHC en las secciones del tumor con el kit de Dako PD-L1 IHC 22-8.

Figura 24 Cambio mejor en el tamaño de la lesión objetivo



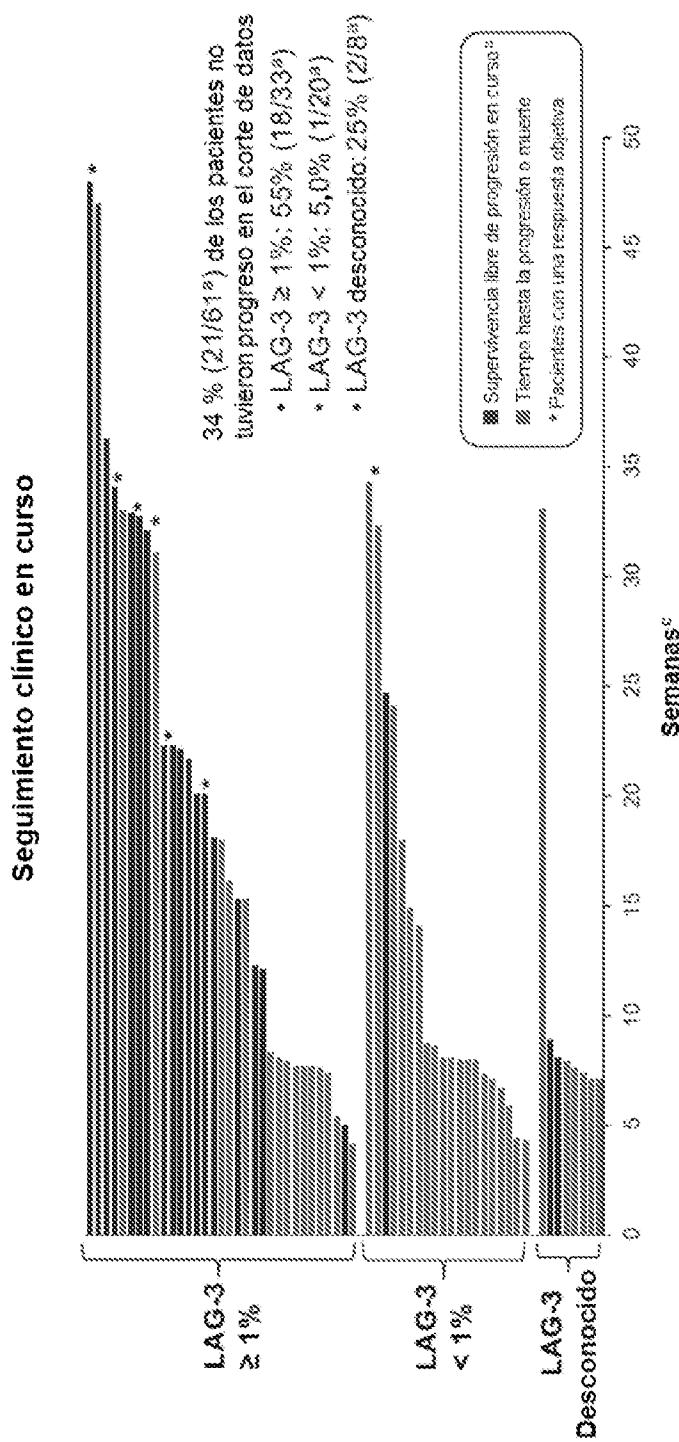
a Seis pacientes con progresión clínica antes de su primera exploración y uno con PD debido a una nueva metástasis cerebral sintomática confirmada por imágenes antes de iniciar las exploraciones completas no fueron incluidos.
b Un paciente con el mejor cambio desde la línea base > 30 % tuvo una mejor respuesta de SD.

Figura 22. Intensidad y duración de la respuesta por la expresión de LAG-3 y de PD-L1



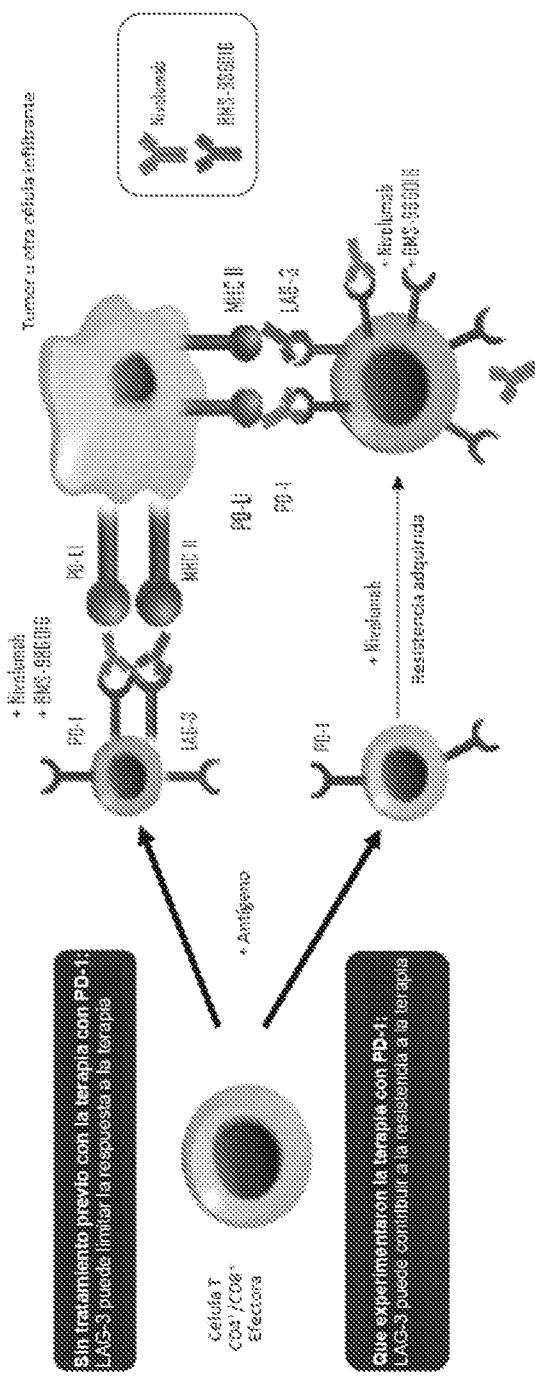
Séis pacientes con progresión clínica antes de su primera exposición y uno con PD desvinculado con una nueva metastasis cerebral sincrónica antes de obtener las exposiciones completas no fueron incluidos

Figura 23



*Pacientes que se pueden evaluar para la respuesta. Nodos progresaron durante la terapia con anti-FO-1/FO-1 previa. *Censurados en la última visita. *Se plantearon evaluaciones para cada 8 semanas.

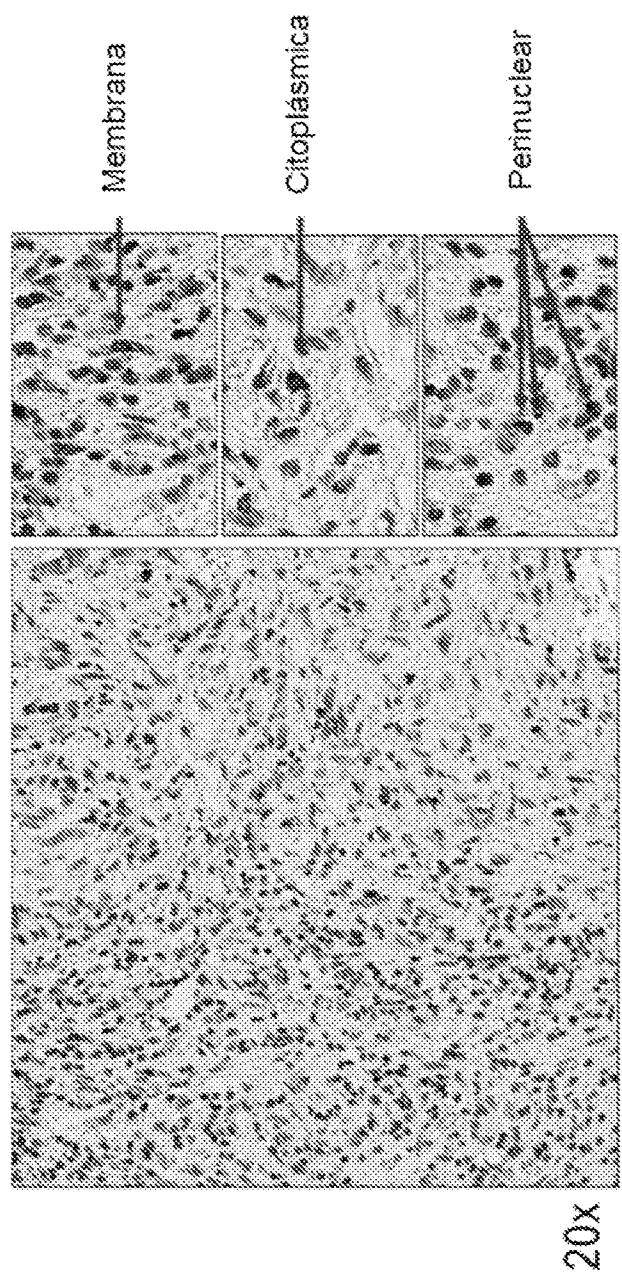
Figura 24
Papel del LAG-3 y del PD-1 en el agotamiento de las células T y utilidad clínica propuesta de BMS-986016 combinado con nivolumab



CD = grupo de diferenciación; LACG-3 = gen 3 de activación de citocinas; NKG-2 = complejo de histocompatibilidad mayor clase I; P2C-1 = genetina programada 1; P2D-1 = ligando 1 de receptor programada 1.

Figura 25

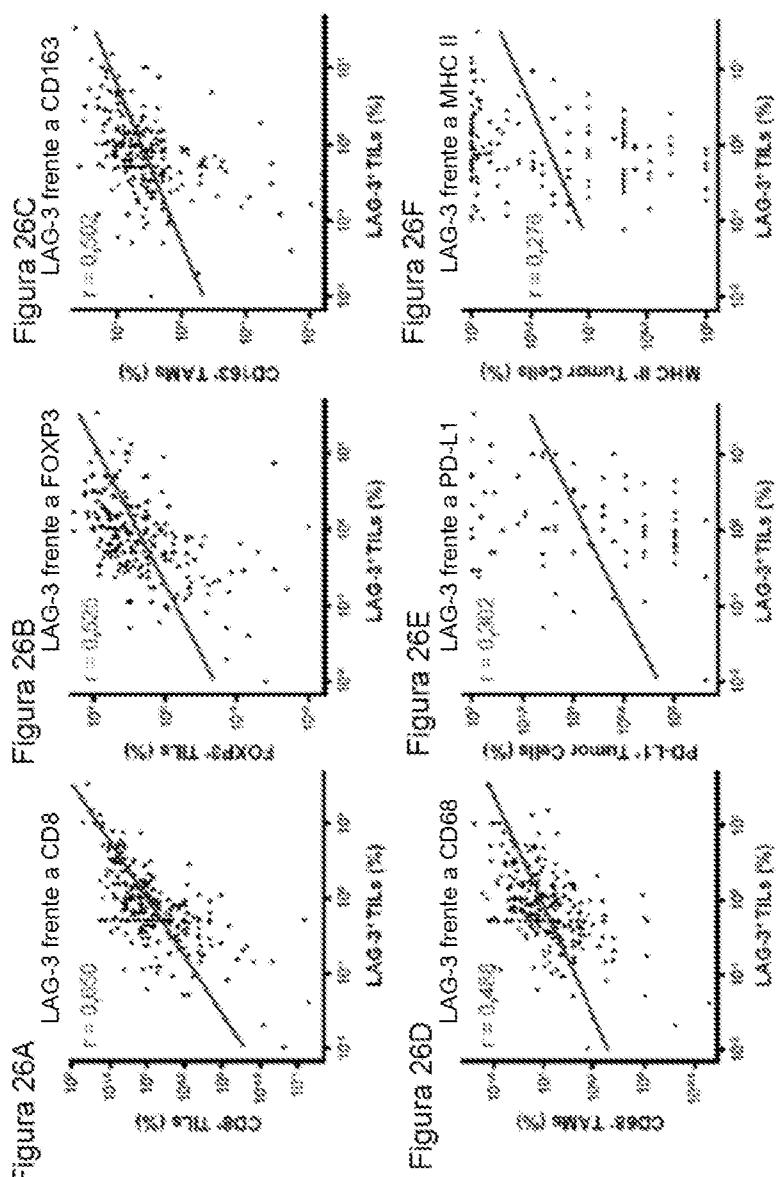
Patrones de expresión de LAG-3 por la tinción de IHC de las células nucleadas totales en una muestra del tumor de melanoma



IHC = inmunohistoquímica; LAG-3 = gen 3 de activación de linfocitos.

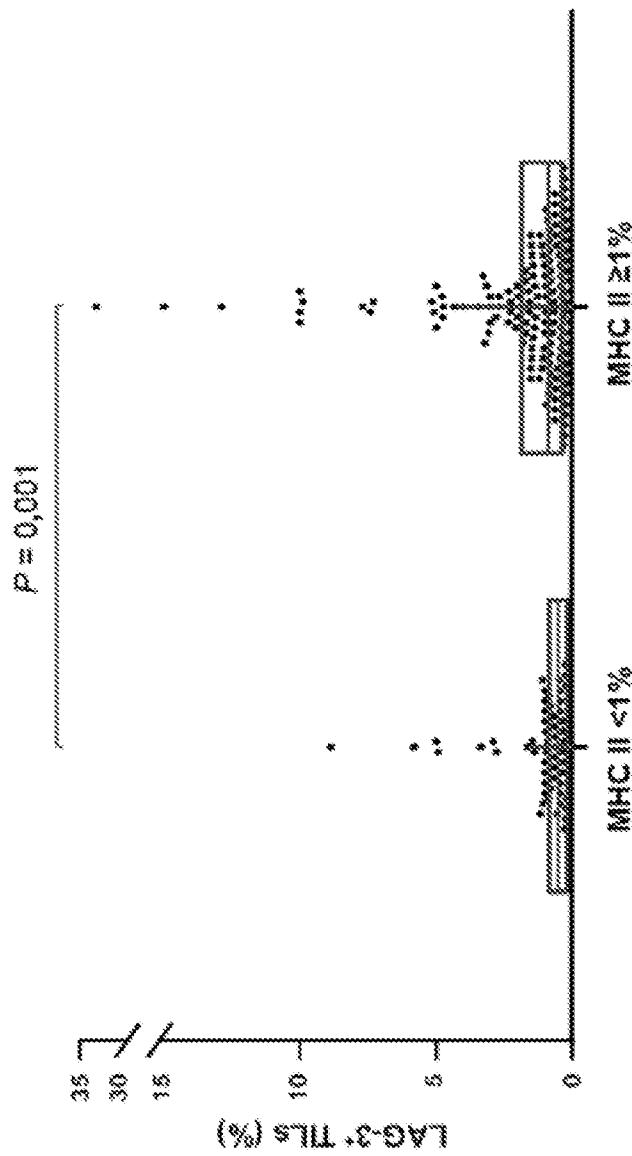
Figuras 26A-F.

Asociación del LAG-3 con los biomarcadores inmunológicos e inflamatorios



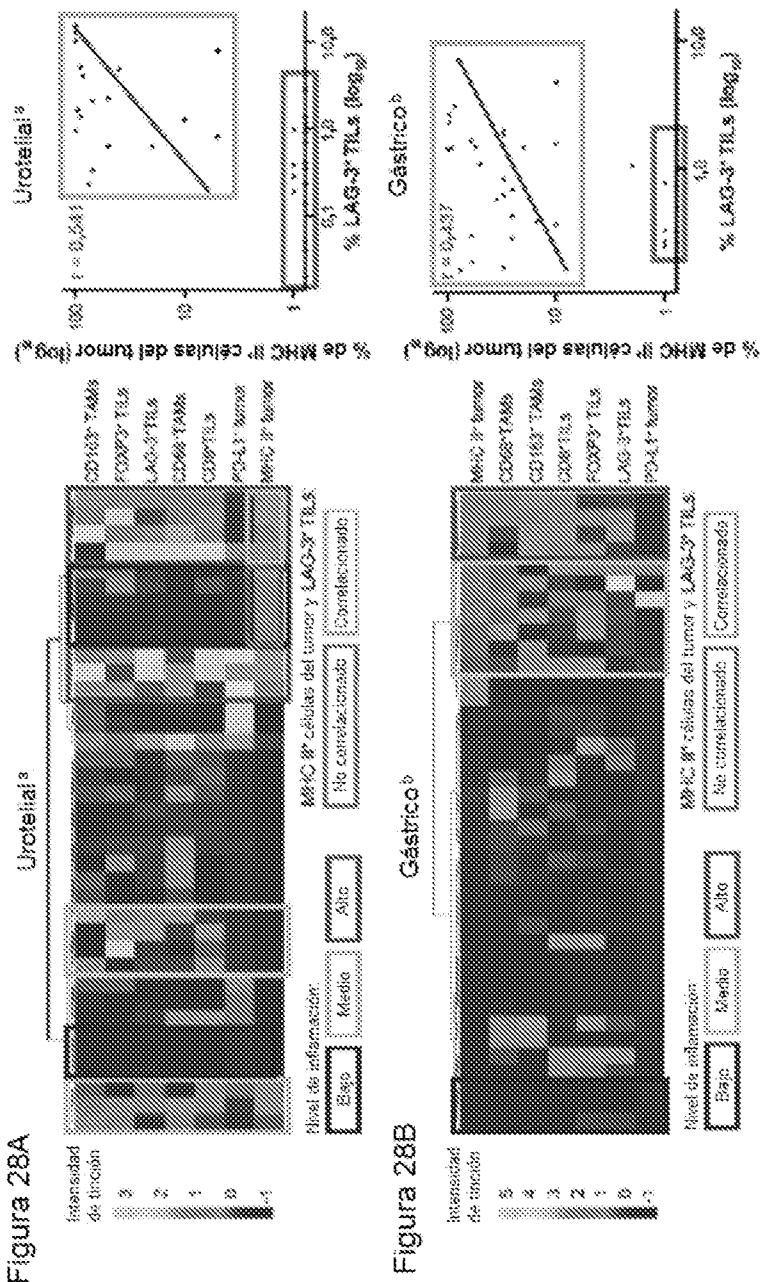
n = 337. LAG-3, CD3, FOXP3, CD163, CD68 cuantificados en las células tumorales; FOXP3 = gen 3 de activación de linfocitos; MHC II = complejo de histocompatibilidad mayor clase II; PD-L1 = ligante 1 de muerte programada I; TIL = macrófagos asociados con el tumor. TIL = infiltrados tumorales.

Figura 27

TIL LAG-3⁺ por expresión de células tumorales de MHC II

n = 241. Las barras verticales representan el intervalo intercuantílico. LAG-3 = gen 3 de activación de linfocitos. MHC II = complejo de histocompatibilidad mayor clase II. TIL = linfocitos infiltrantes del tumor

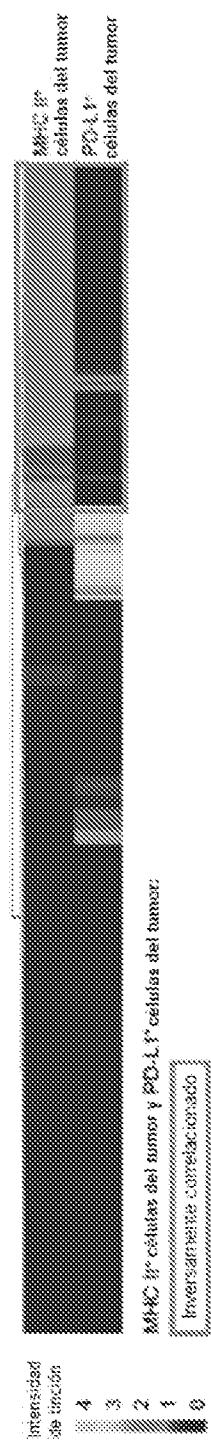
Figuras 28A-B. Relación entre los grupos de inflamación y la expresión de los biomarcadores



en 37 en = 39 en = 229. CD = grupo de diferenciación FOXP3 = caja caniforme de hoxcilla P3. LAG-3 = gen 3 de activación de linfocitos. MHC II = complejo de histocompatibilidad mayor clase II. MSC1/C = cardionina de pánfano de células na pánfano na pánfano. P24.1 = figand 1 de muerte programada. T-AMs = macrófagos associados con el tumor. TILs = linfocitos infiltrantes del tumor.

Figura 28C

Relación entre los grupos de inflamación y la expresión de los biomarcadores
Muestras agrupadas de 6 tipos de tumores



n = 37; m = 39; n = 229; CQ = grupo de difusión; FoxP3 = caja con forma de horquilla; P3, LAG-3 = gen 3 de activación de linfocitos; ICOSL = complejo de histocompatibilidad mayor clase II; ICOSL C = carcinoma de pulmón de células no pequeñas; TIM-1 = ligando 1 de receptor programada 1; TIM-3 = marcadores asociados con el tumor; TIM-3L = lindocitos infiltrantes del tumor.

Figuras 29A-C. Expresión de las células del tumor de MHC II heterogéneas y LAG-3 + TIL.

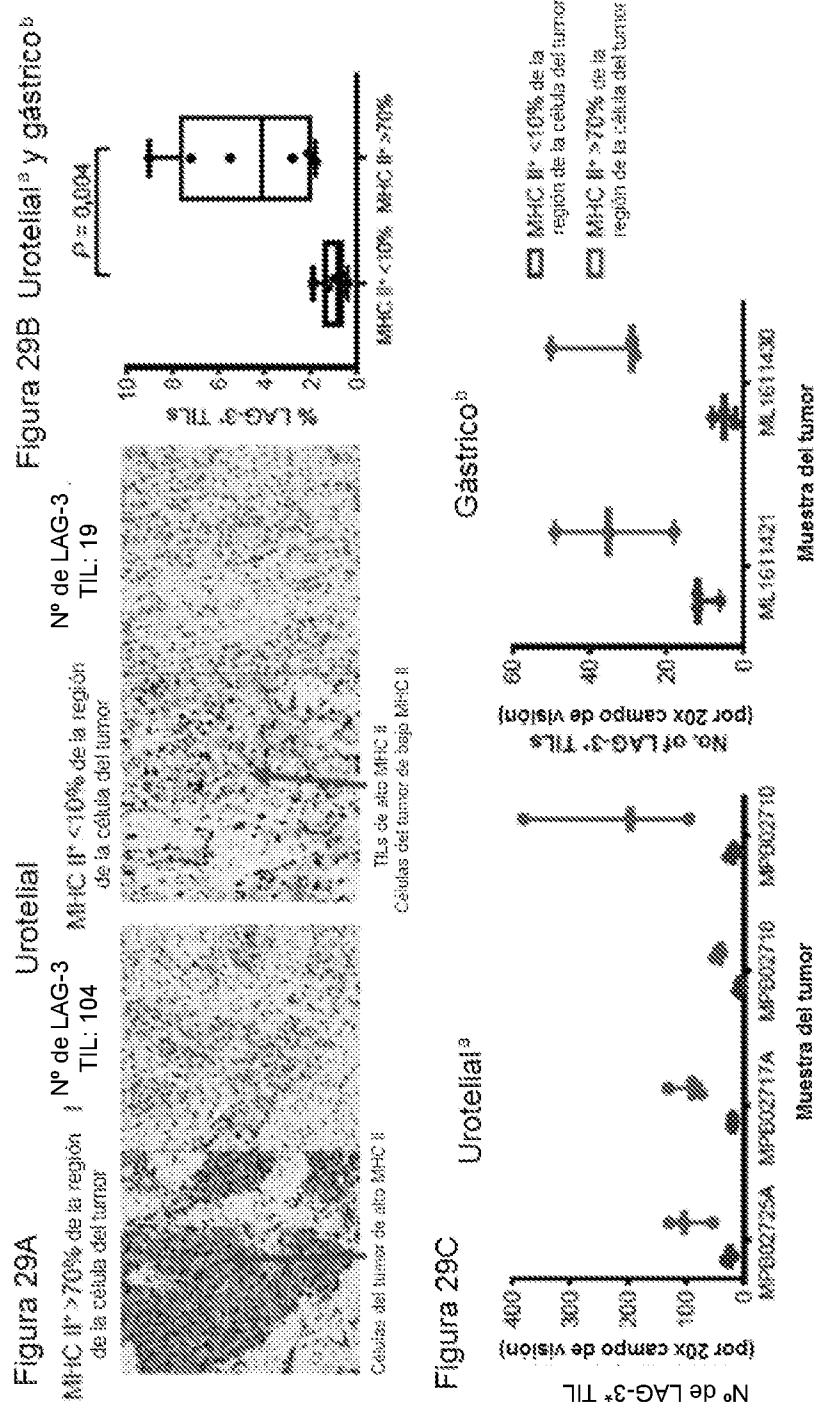


Figura 30A Niveles de ARNm de LAG-3 en la selección y en las semanas 2-4 de la monoterapia con nivolumab

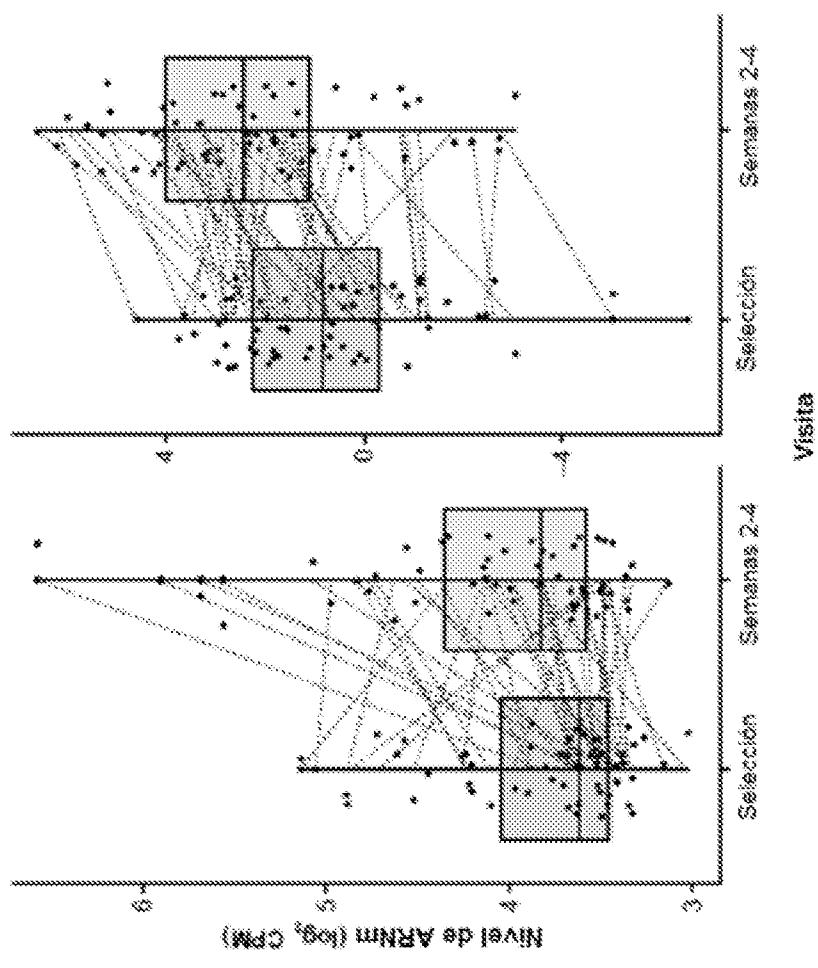


Figura 30B Niveles de ARNm de LAG-3 en la selección y en las semanas 2-4 de la monoterapia con nivolumab

Variables en los niveles de ARNm de LAG-3	Pretratamiento	Posttratamiento	Valor <i>P</i>
n. pretratamiento, post-tratamiento	59, 75	61, 62	
Valor <i>P</i>	0,0479	0,0002	
Veces de aumento promedio desde la línea base del tratamiento	1,2	3,1	

Las líneas sombreadas representan las medias de los pacientes con RCC y carcinoma de las células renales.