



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019016336-0 A2



(22) Data do Depósito: 09/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 31/03/2020

(54) **Título:** CONJUGADO DE ANTICORPO RADIIORROTULADO, MÉTODO PARA IMAGEAMENTO DE UM TECIDO QUE EXPRESSA LAG3 E PARA TRATAR UM TUMOR, E, COMPOSTO.

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/28; A61K 51/10; C07C 259/00; A61K 39/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 10/02/2017 US 62/457287.

(71) **Depositante(es):** REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

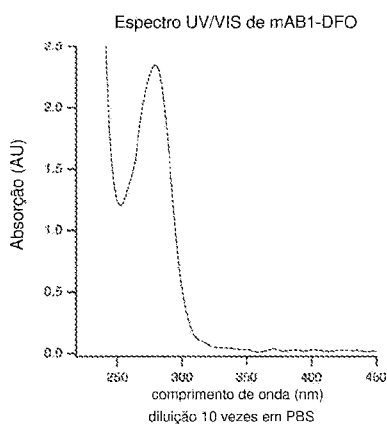
(72) **Inventor(es):** MARCUS KELLY; DANGSHE MA; WILLIAM OLSON; RICHARD TAVARE; GAVIN THURSTON.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018017525 de 09/02/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/148476 de 16/08/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 07/08/2019

(57) **Resumo:** Anticorpos anti-LAG3 radiorrotulados e seu uso no imageamento de imuno-PET são aqui providos. São incluídos métodos para detectar a presença de proteínas LAG3 em um paciente ou amostra.



## CONJUGADO DE ANTICORPO RADIORROTULADO, MÉTODO PARA IMAGEAMENTO DE UM TECIDO QUE EXPRESSA LAG3 E PARA TRATAR UM TUMOR, E, COMPOSTO

### Campo

[001] Esta descrição diz respeito aos anticorpos anti-LAG3 radorrotulados e ao seu uso no imageamento de imuno-PET.

### Listagem de Sequência

[002] Uma cópia oficial da listagem de sequência é submetida concomitante com o relatório descritivo eletronicamente via EFS-Web como uma listagem de sequência formatada em ASCII com um nome de arquivo de “10329WO01\_SEQ\_LIST\_ST25.txt”, uma data de criação de 09 de fevereiro de 2018 e um tamanho de cerca de 254 KB. A listagem de sequência contida neste documento formatado em ASCII é parte do relatório descritivo e é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

### FUNDAMENTOS

[003] As moléculas coestimuladoras e coinibidoras da célula T (coletivamente chamadas de moléculas co-sinalizadoras) desempenham um papel crucial na regulação da ativação da célula T, diferenciação de subconjunto, função efetora e sobrevivência (Chen *et al* 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). Após o reconhecimento dos complexos de peptídeo cognato-MHC nas células que apresentam antígeno através do receptor da célula T (TCR), os receptores de socialização colocalizam com os receptores da célula T na sinapse imune, onde estes sinergizam com a sinalização de TCR para promover ou inibir a ativação e função da célula T (Flies *et al* 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). A resposta imune final é regulada através de um equilíbrio entre os sinais coestimuladores e coinibidores (“pontos de checagem imunológicos”) (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264). O gene 3 de ativação de linfócito (LAG3) funciona como um tal ‘ponto de checagem imunológico’ na mediação da tolerância da célula T periférica.

[004] O LAG3 (também chamado de CD223) é um receptor de proteína de transmembrana com 503 aminoácidos expressado nas células T CD4 e CD8 ativadas, células T  $\gamma\delta$ , células T matadoras naturais, células B, células matadoras naturais, células dendríticas plasmacitoides e células T reguladoras. LAG3 é um membro da superfamília da imunoglobulina (Ig). A função primária do LAG3 é atenuar a resposta imune. O LAG3 ligando às moléculas classe II de MHC resulta na liberação de um sinal negativo para as células que expressam LAG3 e regula para baixo as respostas das células T CD4 e CD8 dependentes de antígeno. O LAG3 regula negativamente a capacidade das células T de proliferar, produzir citocinas e lisar as células alvo, chamada de ‘exaustão’ das células T. O LAG3 é também indicado desempenhar um papel no realce da função da célula reguladora T (Treg) (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264).

[005] A tomografia de emissão de imunopósitron (PET) é uma ferramenta de imageamento de diagnóstico que utiliza anticorpos monoclonais rotulados com emissor de pósitrons, combinando as propriedades de alvejamento de um anticorpo com a sensibilidade das câmeras de tomografia de emissão de pósitron. Ver, por exemplo, *The Oncologist*, 12: 1379 (2007); *Journal of Nuclear Medicine*, 52(8): 1171 (2011). O imuno-PET permite a visualização e quantificação do acúmulo de antígeno e anticorpo *in vivo* e, como tal, pode servir como uma ferramenta importante para diagnósticos e terapia de complemento. Por exemplo, imuno-PET pode ajudar na seleção de candidatos de pacientes potenciais para uma terapia particular, bem como na monitoração do tratamento.

[006] Como o LAG3 emergiu como um alvo para a imunoterapia tumoral e imunoterapia infecciosa, este é necessário para ferramentas de diagnóstico para a terapia anti-LAG3, incluindo, entre outros, ferramentas de diagnóstico que permitem a detecção de candidatos à paciente adequados para a dita terapia.

## BREVE SUMÁRIO

[007] São incluídos nesta descrição os anticorpos anti-LAG3 radiorrotulados conjugados para o uso no imageamento de imuno-PET.

[008] Em um aspecto, o conjugado compreende um anticorpo anti-LAG3 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, uma porção quelante e um emissor de pósitron.

[009] Também são aqui providos os processos para sintetizar os ditos conjugados e intermediários sintéticos úteis para os mesmos.

[0010] Também são aqui providos os métodos de imagear um tecido que expressa LAG3, os métodos compreendendo administrar um anticorpo radiorrotulado anti-LAG3 conjugado aqui descrito ao tecido; e visualizar a expressão de LAG3 pelo imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET).

[0011] Também são aqui providos os métodos de imagear um tecido compreendendo as células que expressam LAG3, por exemplo, linfócitos intratumorais que expressam LAG3, os métodos compreendendo administrar um anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado conjugado aqui descrito ao tecido e visualizar a expressão de LAG3 através do imageamento de PET.

[0012] Também são aqui providos os métodos para detectar LAG3 em um tecido, os métodos compreendendo administrar um anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado conjugado aqui descrito ao tecido; e visualizar a expressão de LAG3 através do imageamento de PET. Em uma modalidade, o tecido está presente em um sujeito humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero não humano. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma doença ou distúrbio tal como câncer, uma doença inflamatória ou uma infecção.

[0013] Também são aqui providos os métodos para identificar um paciente a ser adequado para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido, administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado aqui



descrito e visualizar o conjugado de anticorpo radiorrotulado administrado no tumor através do imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor identifica o paciente como adequado para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3.

[0014] Também são aqui providos os métodos de tratar um tumor, os métodos compreendendo selecionar um sujeito com um tumor sólido; determinar que o tumor sólido é positivo para LAG3; e administrar uma terapia antitumoral ao sujeito em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3. Em algumas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1). Em algumas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3 e/ou um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1. Em algumas modalidades, o sujeito é administrado com um anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado conjugado aqui descrito e a localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado é imageada por intermédio do imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET) para determinar se o tumor é positivo para LAG3. Em algumas modalidades, o sujeito também é administrado com um conjugado de anticorpo anti-PD-1 radiorrotulado e a localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado é imageada por intermédio da tomografia de emissão de pósitron (PET) para determinar se o tumor é positivo para PD-1.

[0015] Também são aqui providos os métodos para monitorar a eficácia de uma terapia antitumoral em um sujeito, em que os métodos compreendem selecionar um sujeito com um tumor sólido em que o sujeito está sendo tratado com uma terapia antitumoral; administrar um conjugado de anti-LAG3 radiorrotulado aqui descrito ao sujeito; imagear a localização do conjugado radiorrotulado administrado no tumor através do imageamento de PET; e determinar o crescimento tumoral, em que uma diminuição da linha de

base na absorção do conjugado ou sinal radiorrotulado indica uma eficácia da terapia antitumoral. Em algumas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3 (por exemplo, um anticorpo anti-LAG3). Em algumas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3 e um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1. Em algumas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de PD-1 (por exemplo, REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab e pembrolizumab), um inibidor de PD-L1 (por exemplo, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105 e REGN3504, bem como aqueles divulgados na Publicação de Patente No. US 2015-0203580), inibidor de CTLA-4 (por exemplo, ipilimumab), um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T (por exemplo, um anticorpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 ou VISTA), um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [por exemplo, um “VEGF-Trap” tal como aflibercept ou outra proteína de fusão que inibe a proteína VEGF como apresentado na US 7.087.411 ou um anticorpo anti-VEGF ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (por exemplo, bevacizumab ou ranibizumab) ou um inibidor de cinase de molécula pequena do receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib ou pazopanib)], um inibidor de Ang2 (por exemplo, nesvacumab), um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, erlotinib, cetuximab), um inibidor de CD20 (por exemplo, um anti-CD20 anticorpo tal como rituximab), um anticorpo para um antígeno específico de tumor [por exemplo, CA9, CA125, antígeno 3 associado com melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionário (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico da próstata (PSA), mucina-1, MART-1 e CA19-9], uma vacina (por exemplo, bacilo Calmette-

Guerin, uma vacina contra o câncer), um adjuvante para aumentar a apresentação do antígeno (por exemplo, fator que estimula colônia de granulócito-macrófago), um anticorpo biespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico CD3xCD20 ou anticorpo biespecífico PSMAxCD3), uma citotoxina, um agente quimioterapêutico (por exemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel e vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R (por exemplo, sarilumab), um inibidor de IL-4R (por exemplo, dupilumab), um inibidor de IL-10, uma citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15 e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) (por exemplo, ADC anti-CD19-DM4 e ADC anti-DS6-DM4).

[0016] Também são aqui providos os métodos para prognosticar a resposta de um paciente a uma terapia antitumoral, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido; e determinar se o tumor é positivo para LAG3, em que se o tumor é positivo para LAG3 este prediz uma resposta positiva do paciente para uma terapia antitumoral. Em algumas modalidades, o tumor é determinado positivo administrando-se um conjugado de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado da presente descrição e localizando o conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor através do imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é positivo para LAG3. Em algumas modalidades, a terapia antitumoral é selecionada de um inibidor de PD-1 (por exemplo, REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab e pembrolizumab), um inibidor de PD-L1 (por exemplo, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105 e REGN3504), inibidor de CTLA-4 (por exemplo, ipilimumab), um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T (por exemplo, um

anticorpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 ou VISTA), um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [por exemplo, um “VEGF-Trap” tal como aflibercept ou outra proteína de fusão que inibe VEGF como apresentado na US 7.087.411 ou um anticorpo anti-VEGF ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (por exemplo, bevacizumab ou ranibizumab) ou um inibidor de cinase de molécula pequena do receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib ou pazopanib)], um Inibidor de Ang2 (por exemplo, nesvacumab), um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, erlotinib, cetuximab), um inibidor de CD20 (por exemplo, um anticorpo anti-CD20 tal como rituximab), um anticorpo para um antígeno específico de tumor [por exemplo, CA9, CA125, antígeno 3 associado com melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionário (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico da próstata (PSA), mucina-1, MART-1 e CA19-9], uma vacina (por exemplo, bacilo Calmette-Guerin, uma vacina contra o câncer), um adjuvante para aumentar a apresentação de antígeno (por exemplo, fator que estimula colônia de granulócito-macrófago), um anticorpo biespecífico (por exemplo, anticorpo de CD3xCD20 biespecífico ou anticorpo biespecífico de PSMAxCD3), uma citotoxina, um agente quimioterapêutico (por exemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel e vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R (por exemplo, sarilumab), um inibidor de IL-4R (por exemplo, dupilumab), um inibidor de IL-10, uma citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15 e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) (por exemplo, ADC anti-CD19-DM4 e ADC anti-DS6-DM4).

[0017] Também são aqui providos os métodos para prognosticar a

resposta de um paciente a uma terapia antitumoral compreendendo um inibidor LAG3, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido; e determinar se o tumor é positivo para LAG3, em que se o tumor é positivo para LAG3 este indica uma resposta positiva do paciente a uma terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3. Em algumas modalidades, o tumor é determinado positivo administrando-se um anticorpo radiorrotulado anti-LAG3 conjugado da presente descrição e localizando o conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor através do imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é positivo para LAG3.

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DAS FIGURAS

[0018] A Figura 1 descreve o espectro de UV/VIS do anticorpo anti-LAG3 modificado com DFO (mAb1-DFO).

[0019] A Figura 2 descreve a HPLC-SEC do Anticorpo anti-LAG3 modificado com DFO.

[0020] A Figura 3 descreve a rádio-SEC-HPLC do isótipo-DFO-conjugado depois da radiorrotulação com  $^{89}\text{Zr}$  para Estudo 1.

[0021] A Figura 4 descreve a rádio-SEC-HPLC do anti-LAG3-DFO-conjugado depois da radiorrotulação com  $^{89}\text{Zr}$  para o Estudo 1.

[0022] A Figura 5 descreve a rádio-SEC-HPLC do anti-LAG3-DFO-conjugado depois da radiorrotulação com  $^{89}\text{Zr}$  para o Estudo 2.

[0023] A Figura 6 descreve o cromatograma de UV280-SEC-HPLC e traço de rádio-iTLC do isótipo-DFO-conjugado depois da radiorrotulação com  $^{89}\text{Zr}$  para o Estudo 1.

[0024] A Figura 7 descreve o cromatograma de UV280-SEC-HPLC e traço de rádio-iTLC do anti-LAG3-DFO-conjugado depois da radiorrotulação de  $^{89}\text{Zr}$  para o Estudo 1.

[0025] A Figura 8 descreve o cromatograma de UV280-SEC-HPLC e radio-iTLC traço de anti-LAG3-DFO-conjugado depois da radiorrotulação de

$^{89}\text{Zr}$  para o Estudo 2.

[0026] A Figura 9 provê imagens representativas de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 injetadas a uma dose de proteína de 5 mg/kg (Ms01) ou 0,03 mg/kg (Ms14) demonstrando o alvejamento específico de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 para tumores de Raji/hPBMC usando 0,03 mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 e bloqueio a 5 mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1. A absorção específica no baço e linfonodos é vista na dose menor de 0,03 mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1.

[0027] A Figura 10 mostra a expressão de LAG3 em amostras de tecido de xenoenxertos de PBMC/Raji (obtidos a 27 dias e 15 dias depois do implante tumoral) e nas amostras clínicas de melanoma.

[0028] A Figura 11 provê dados que demonstram que REGN2810 anti-humano PD-1 Ab e mAb1 anti-humano LAG-3, respectivamente, aumentam as células T LAG-3+ e as células T PD-1+ em um microambiente tumoral.

[0029] A Figura 12 provê características das amostras de melanoma estudadas no exemplo 7.

## DESCRIÇÃO DETALHADA

### I. Definições

[0030] A menos que de outro modo aqui definido, todas as técnicas e termos científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por aquele de habilidade comum na técnica à qual o assunto principal pertence.

[0031] O termo “LAG3” se refere ao gene 3 da proteína de ativação de linfócito, um receptor do ponto de checagem imunológico ou coinibidor da célula T, também conhecido como CD223. A sequência de aminoácido de LAG3 de comprimento total é provida no GenBank como número de acesso NP\_002277,4 e também é aqui indicada como a SEQ ID NO: 582. O termo “LAG3” também inclui variantes proteicas de LAG3 tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NOs: 574, 575 ou 576. O termo “LAG3” inclui o

LAG3 recombinante ou um fragmento do mesmo. O termo também abrange o LAG3 ou um fragmento do mesmo ligado a, por exemplo, etiqueta de histidina, Fc de camundongo ou humano ou uma sequência de sinal tal como a sequência de sinal de ROR1. Por exemplo, o termo inclui as sequências exemplificadas pela SEQ ID NO: 575, compreendendo um camundongo Fc (mIgG2a) no C-terminal, ligado aos resíduos de aminoácido de 29 a 450 do LAG3 de ectodomínio de comprimento total. As variantes proteicas como exemplificado pela SEQ ID NO: 574 compreendem uma etiqueta de histidina no terminal C, ligado aos resíduos de aminoácido de 29 a 450 do LAG3 de ectodomínio de comprimento total. A menos que especificado como sendo de uma espécie não humana, o termo “LAG3” significa LAG3 humano.

[0032] O LAG3 é um membro da superfamília da imunoglobulina (Ig). O LAG3 é uma proteína de transmembrana tipo 1 com quatro domínios semelhantes a Ig extracelulares de D1 a D4 e é expressado nos linfócitos intratumorais incluindo as células T ativadas, as células matadoras naturais, células B, células dendríticas plasmacitoides e células T reguladoras. O receptor de LAG3 liga às moléculas de MHC classe II presentes nas células que apresentam antígeno (APCs).

[0033] O termo “B7-1” se refere ao antígeno de ativação do linfócito T, também conhecido como fator coestimulatório CD80. B7-1 é um receptor de membrana do aminoácido 288 com um domínio N-terminal extracelular que compreende regiões semelhantes a IgV (aa 37 a 138) e semelhantes a IgC (aa 154 a 232), um domínio de transmembrana (aa 243 a 263) e uma região intracelular de terminal C (aa 263 a 288). A sequência de aminoácido de tamanho natural B7-1 é provida no GenBank como número de acesso NP\_005182.1.

[0034] Como aqui usado, o termo “coinibidor da célula T” se refere a um ligante e/ou receptor que modula a resposta imune por intermédio da ativação ou supressão da ativação da célula T. O termo “coinibidor da célula

T”, também conhecido como molécula cossinalizadora da célula T, inclui, mas não é limitado a, proteína do gene 3 de ativação do linfócito (LAG-3, também conhecida como CD223), morte programada-1 (PD-1), antígeno-4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), B e atenuador do linfócito T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, imunoglobulina da célula T e mucina-3 (TIM3), imunorreceptor da célula T com imunoglobulina e domínios ITIM (TIGIT; também conhecido como VSIG9), receptor 1 semelhante à imunoglobulina associada com leucócito (LAIR1; também conhecido como CD305), Co estimulador indutível de célula T (ICOS; também conhecido como CD278), B7-1 (CD80) e CD160.

[0035] O termo “anticorpo”, como aqui usado, é intencionado se referir às moléculas de imunoglobulina compreendidas de quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto (isto é, “moléculas de anticorpo inteiras”), bem como multímeros do mesmo (por exemplo, IgM) ou fragmento de ligação a antígenos do mesmo. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (“HCVR” ou “V<sub>H</sub>”) e uma região constante de cadeia pesada (compreendida de domínios C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3). Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (“LCVR ou “V<sub>L</sub>”) e uma região constante de cadeia leve (C<sub>L</sub>). As regiões de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> também podem ser divididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDR), interdispersas com as regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de estrutura (FR). Cada V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> é composta de três CDRs e quatro FRs, arrançadas a partir do terminal amino para o terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em algumas modalidades, as FRs do anticorpo (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo) podem ser idênticas às sequências de linha germinal humana ou podem ser naturalmente ou artificialmente modificadas. Uma sequência de consenso de aminoácido pode



ser definida com base em uma análise lado a lado de duas ou mais CDRs.

[0036] A substituição de um ou mais resíduos da CDR ou a omissão de uma ou mais CDRs também é possível. Os anticorpos foram descritos na literatura científica em que uma ou duas CDRs podem ser dispensadas para ligação. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) analisaram as regiões de contato entre os anticorpos e seus antígenos, com base nas estruturas cristalinas publicadas e concluíram que apenas cerca de um quinto a um terço dos resíduos de CDR realmente comunicam com o antígeno. A Padlan também encontrou muitos anticorpos em que uma ou duas das CDRs não tiveram aminoácidos em contato com um antígeno (ver também, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0037] Os resíduos de CDR que não comunicam o antígeno podem ser identificados com base nos estudos anteriores (por exemplo, resíduos H60-H65 em CDRH2 frequentemente não são necessários), das regiões das CDRs de Kabat fora das CDRs de Chothia, através da modelagem molecular e/ou empiricamente. Se uma CDR ou resíduo(s) do mesmo são omitidos, esta é geralmente substituída com um aminoácido que ocupa a posição correspondente em outra sequência de anticorpo humano ou um consenso de tais sequências. As posições para a substituição dentro das CDRs e aminoácidos para substituir também podem ser empiricamente selecionados. As substituições empíricas podem ser substituições conservativas ou não conservativas.

[0038] Os anticorpos monoclonais anti-LAG3 aqui divulgados podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou exclusões de aminoácido na estrutura e/ou regiões de CDR dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve se comparado às sequências de linhagem germinal correspondentes. Tais mutações podem ser prontamente determinadas comparando-se a sequência de aminoácidos aqui divulgadas às sequências da linhagem terminal de, por exemplo, bancos de dados públicos de sequência de

anticorpo. A presente descrição inclui anticorpos e fragmentos de ligação aos antígenos dos mesmos, que são derivadas a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos aqui divulgadas, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais estruturas e/ou regiões de CDR são mutados ao(s) resíduo(s) correspondente(s) da sequência de linhagem terminal a partir da qual o anticorpo foi derivado ou ao(s) resíduo(s) correspondente(s) de outra sequência de linha germinal humana ou a uma substituição de aminoácido conservativa da linha germinal correspondente (tais mudanças de sequência são aqui coletivamente indicadas como “mutações de linhagem terminal”). Uma pessoa de habilidade comum na técnica, começando com as sequências de região variável de cadeia pesada e leve aqui divulgadas, pode produzir facilmente vários anticorpos e fragmentos de ligação aos antígenos que compreendem uma ou mais mutações de linha germinal individual ou combinações das mesmas. Em algumas modalidades, todas das estruturas e/ou resíduos de CDR dentro dos domínios  $V_H$  e/ou  $V_L$  são novamente mutados aos resíduos encontrados na sequência de linhagem germinal original a partir da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas alguns resíduos são novamente mutados à sequência de linhagem germinal original, por exemplo, apenas os resíduos mutados encontrados dentro dos primeiros 8 aminoácidos da FR1 ou dentro dos últimos 8 aminoácidos da FR4 ou apenas os resíduos mutados encontrados dentro das CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, uma ou mais da estrutura e/ou resíduo(s) de CDR são mutados aos resíduo(s) correspondente(s) de uma sequência de linhagem terminal diferente (isto é, uma sequência de linhagem terminal que é diferente da linhagem terminal a partir da qual o anticorpo foi originalmente derivado). Além disso, os anticorpos da presente descrição pode conter qualquer combinação de duas ou mais mutações da linhagem terminal dentro da estrutura e/ou regiões de CDR, por exemplo, em que alguns resíduos individuais são mutados ao resíduo correspondente de uma sequência de

linhagem terminal particular enquanto alguns outros resíduos que diferem da sequência de linhagem terminal da sequência são mantidos ou são mutados ao resíduo correspondente de uma sequência de linhagem terminal diferente. Uma vez obtidos, os anticorpos e fragmentos de ligação aos antígenos que contêm uma ou mais mutações de linhagens germinais podem ser facilmente testados quanto uma ou mais propriedades desejadas tais como, especificidade de ligação melhorada, afinidade de ligação melhorada, propriedades biológicas antagonísticas ou agonísticas melhoradas ou aperfeiçoadas (como for o caso), imunogenicidade reduzida, etc. Os anticorpos e fragmento de ligação aos antígenos obtidos desta maneira geral estão abrangidos dentro da presente descrição.

[0039] A presente descrição também inclui anticorpos monoclonais anti-LAG3 compreendendo as variantes de qualquer um de HCVR, LCVR, e/ou sequência de aminoácidos da CDR aqui divulgadas tendo uma ou mais substituições conservativas. Por exemplo, a presente descrição inclui anticorpos anti-LAG3 tendo HCVR, LCVR, e/ou sequência de aminoácidos da CDR com, por exemplo, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. As substituições de aminoácido conservativas com relação a qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR, LCVR, e/ou CDR aqui divulgadas.

[0040] O termo “anticorpo humano”, como aqui usado, é intencionado incluir os anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de linhagem germinal da imunoglobulina humana. As mAbs humanas da descrição podem incluir os resíduos de amino não codificados pelas sequências da imunoglobulina da linhagem germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas através da mutagênese aleatória ou específica de local *in vitro* ou através da mutação somática *in vivo*), por exemplo nas CDRs e em particular na CDR3. Contudo, o termo “anticorpo humano”, como aqui usado, não é intencionado incluir as mAbs em as

sequências de CDR derivadas da linhagem germinal de uma outra espécie mamífera (por exemplo, camundongo), foram enxertadas nas sequências de FR humanas.

[0041] O termo “moléculas de ligação a antígeno multiespecíficas”, como aqui usado se referem às moléculas de ligação ao antígeno biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas e o fragmento de ligação aos antígenos do mesmo. As moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas podem ser específicas para diferentes epítomos de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação ao antígeno específico para os epítomos de mais do que um polipeptídeo alvo. Uma molécula de ligação ao antígeno multiespecífica pode ser um polipeptídeo multifuncional único ou pode ser um complexo multimérico de dois ou mais polipeptídeos que são covalentemente ou não covalentemente associados uns com os outros. O termo “moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas” incluem os anticorpos da presente descrição que podem ser ligadas a ou coexpressadas com outras moléculas funcionais, por exemplo, um outro peptídeo ou proteína. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo podem ser funcionalmente ligados (por exemplo, através da ligação química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a um ou mais outras entidades moleculares, tais como uma proteína ou fragmento do mesmo para produzir uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica ou um multiespecífica com uma segunda especificidade de ligação. De acordo com a presente descrição, o termo “moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas” também inclui anticorpos biespecíficos, triespecíficos ou multiespecíficos ou fragmentos de ligação a antígenos do mesmo. Em algumas modalidades, um anticorpo da presente descrição é funcionalmente ligado ao outro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para produzir um anticorpo biespecífico com uma segunda especificidade de ligação. Os anticorpos biespecíficos e multiespecíficos da presente descrição

são aqui descritos em outro lugar.

[0042] Os termos “liga especificamente” ou “liga especificamente a” ou outros, significam que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo forma um complexo com um antígeno que é relativamente estável sob condições fisiológicas. A ligação específica pode ser caracterizada através de uma constante de dissociação de reequilíbrio de pelo menos cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos (por exemplo, uma  $K_D$  menor indica uma ligação mais firme). Os métodos para determinar se duas moléculas ligam especificamente são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância de plasma na superfície e outros. Como aqui descrito, os anticorpos foram identificados através da ressonância de plasma na superfície, por exemplo, BIACORE®, que liga especificamente ao LAG3. Além disso, os anticorpos multiespecíficos que ligam a um outro domínio em LAG3 e um ou mais antígenos adicionais ou um biespecífico que liga às duas regiões diferentes de LAG3 são, entretanto, considerados anticorpos que “ligam especificamente”, como aqui usado.

[0043] Os termos “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo, “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo e os semelhantes, como aqui usado, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obteníveis, sintéticos ou geneticamente engenheirados que especificamente ligam um antígeno para formar um complexo. Os termos “fragmento de ligação ao antígeno” de um anticorpo ou “fragmento de anticorpo”, como aqui usado, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de ligar ao LAG3.

[0044] Um “anticorpo isolado”, como aqui usado, é intencionado se referir a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos (Abs) tendo diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente liga LAG3 ou um fragmento do mesmo, é substancialmente isento de Abs que especificamente liga os

antígenos outros que não LAG3.

[0045] O termo “ressonância plasmônica de superfície”, como aqui usado, se refere a um fenômeno ótico que permite a análise das interações biomoleculares em tempo real através da detecção das alterações nas concentrações proteica dentro de uma matriz de biossensor, por exemplo, usando o sistema BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, N.J.).

[0046] O termo “ $K_D$ ”, como aqui usado, é intencionado se referir à constante de dissociação de equilíbrio de uma interação de anticorpo-antígeno particular.

[0047] O termo “epítopo” se refere a uma determinante antigênica que interage com um local de ligação ao antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um antígeno único pode ter mais do que um epítopo. Deste modo, diferentes anticorpos podem ligar à diferentes áreas em um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. O termo “epítopo” também se refere a um local em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Este também se refere a uma região de um antígeno que é ligado por um anticorpo. Os epítopos podem ser definidos como estrutural ou funcional. Os epítopos funcionais são geralmente um subconjunto dos epítopos estruturais e têm aqueles resíduos que diretamente contribuem para a afinidade da interação. Os epítopos também podem ser configuracionais, isto é, compostos de aminoácidos não lineares. Em algumas modalidades, os epítopos podem incluir determinantes que são agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforila ou grupos sulfonila, e, em algumas modalidades, pode ter características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específicas.

[0048] O termo “identidade substancial” ou “substancialmente idêntico,” quando se referindo a um ácido nucléico ou fragmento do mesmo,

indica que, quando otimamente alinhado com as inserções ou exclusões de nucleotídeo apropriadas com um outro ácido nucléico (ou seu filamento complementar), existe uma identidade de sequência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 90 % e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % das bases de nucleotídeo, como medido por qualquer algoritmo bem conhecido da identidade de sequência, tal como FASTA, BLAST ou GAP.

[0049] Como aplicado aos polipeptídeos, o termo “similaridade substancial” ou “substancialmente similar” significa que duas sequências de peptídeos, quando otimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de intervalo de default, compartilham pelo menos 90 % de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 95 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência. Preferivelmente, as posições de resíduo, que não são idênticas, diferem em substituições de aminoácido conservativas. Uma “substituição de aminoácido conservativa” é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservativa não mudará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos onde duas ou mais sequências de aminoácidos diferem uma das outras através das substituições conservativas, a porcentagem ou grau de similaridade podem ser ajustados para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Os meios para fazer este ajuste são bem conhecidos aqueles de habilidade na técnica. Ver, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que é aqui incorporada por referência. Os exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais de hidroxila alifática: serina e treonina; 3) cadeias laterais

contendo amina: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Os grupos de substituição de aminoácidos conservativos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservativa é qualquer mudança tendo um valor positivo na matriz de log probabilidade PAM250 divulgada em Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443 45, aqui incorporada por referência. Uma substituição “moderadamente conservativa” é qualquer mudança tendo um valor não-negativo na matriz de log probabilidade PAM250. A similaridade de sequência para os polipeptídeos é tipicamente medida usando o software de análise de sequência. O software de análise de proteína emparelha sequências similares usando medidas de similaridade designadas para várias substituições, exclusões e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservativas. Por exemplo, o software de GCG contém programas tais como GAP e BESTFIT que podem ser usados com parâmetros padrão para determinar a homologia de sequência ou a identidade de sequência entre os polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos a partir de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína do tipo selvagem e uma muteína da mesma. Ver, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos também podem ser comparadas usando FASTA com parâmetros padrão ou recomendados; um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) provê alinhamentos e uma identidade de sequência em por cento das regiões da melhor sobreposição entre a pergunta e as sequências de pesquisa (Pearson (2000) *supra*). Um outro algoritmo preferido quando comparando a uma sequência da descrição para um banco de dados contendo um grande número de sequências de



diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, usando parâmetros padrão. Ver, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 e (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, cada uma a qual é aqui incorporada por referência.

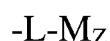
[0050] Pela frase “quantidade terapeuticamente eficaz” é intencionado significar uma quantidade que produz o efeito desejado para o qual é administrado. A quantidade exata dependerá do propósito do tratamento e será determinada por uma pessoa versada na técnica usando técnicas conhecidas (ver, por exemplo, Lloyd (1999) The Art, Science e Technology of Pharmaceutical Compounding).

[0051] Como aqui usado, o termo “sujeito” se refere a um animal, preferivelmente um mamífero, em necessidade de melhora, prevenção e/ou tratamento de uma doença ou distúrbio tal como uma infecção viral crônica, câncer ou doença autoimune.

## II. Imunoconjugados Radiorrotulados de Anticorpos LAG3 para o Imageamento de imuno-PET

[0052] São aqui providas proteínas de ligação ao antígeno radiorrotuladas que ligam LAG3. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação ao antígeno radiorrotuladas compreendem uma proteína de ligação ao antígeno covalentemente ligada a um emissor de pósitron. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação ao antígeno radiorrotuladas compreendem as proteínas de ligação ao antígeno covalentemente ligadas a uma ou mais porções quelantes, que são porções químicas que são capazes de quelar um emissor de pósitron.

[0053] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação ao antígeno que ligam LAG3, por exemplo, anticorpos, são providas, em que as ditas proteínas de ligação aos antígenos que ligam LAG3 são covalentemente ligadas a uma ou mais porções tendo a seguinte estrutura:



em que L é uma porção quelante; M é um emissor de pósitron; e z, independentemente em cada ocorrência, é 0 ou 1; e em que pelo menos um de z é 1.

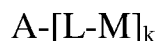
[0054] Em algumas modalidades, a porção quelante das proteínas de ligação ao antígeno radiorrotuladas é um composto da fórmula (I):



(I)

[0055] A é uma proteína que liga LAG3; L é uma porção quelante; M é um emissor de pósitron; z é 0 ou 1; e k é um número inteiro de 0 a 30. Em algumas modalidades, k é 1.

[0056] Em algumas modalidades, as proteínas radiorrotuladas de ligação ao antígeno é um composto da fórmula (II):



(II)

em que A é uma proteína que liga LAG3; L é uma porção quelante; M é um emissor de pósitron; e k é um número inteiro de 1 a 30.

[0057] Em algumas modalidades, são aqui providas as composições compreendendo um conjugado tendo a seguinte estrutura:



em que A é uma proteína que liga LAG3; L é uma porção quelante; e k é um número inteiro de 1 a 30; em que o conjugado é quelado com um emissor de pósitron em uma quantidade suficiente para prover uma atividade específica adequada para o imageamento clínico de PET.

[0058] As proteínas de ligação, porções quelantes e emissor de pósitrons adequados são providos abaixo.

### **A. Proteínas de Ligação de LAG3**

[0059] A proteína de ligação de LAG3 adequadas são as proteínas que ligam especificamente ao LAG3, incluindo aquelas descritas na PCT/US16/56156, aqui incorporada por referência na sua totalidade. Os

anticorpos anti-LAG3 exemplares da presente descrição são listados na Tabela 1 da PCT/US16/56156, também apresentada abaixo.

Tabela 1: Identificadores da sequência de aminoácido

Designação do Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M14985N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M14987N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M14811N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M14885N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M14926N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M14927N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M14931N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M18336N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M18337N	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H15477P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H15483P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H15484P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H15491P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H17823P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H17826P2	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H17828P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H4sH15460P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4sH15462P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4sH15463P	290	292	294	296	298	300	302	304
H4sH15464P	306	308	310	312	314	316	318	320
H4sH15466P	322	324	326	328	330	332	334	336
H4sH15467P	338	340	342	344	346	348	350	352
H4sH15470P	354	356	358	360	362	364	366	368
H4sH15475P	370	372	374	376	378	380	382	384
H4sH15479P	386	388	390	392	394	396	398	400
H4sH15480P	402	404	406	408	410	412	414	416
H4sH15482P	418	420	422	424	426	428	430	432
H4sH15488P	434	436	438	440	442	444	446	448
H4sH15496P2	450	452	454	456	522	524	526	528
H4sH15498P2	458	460	462	464	522	524	526	528
H4sH15505P2	466	468	470	472	522	524	526	528
H4sH15518P2	474	476	478	480	522	524	526	528
H4sH15523P2	482	484	486	488	522	524	526	528
H4sH15530P2	490	492	494	496	522	524	526	528
H4sH15555P2	498	500	502	504	530	532	534	536
H4sH15558P2	506	508	510	512	530	532	534	536
H4sH15567P2	514	516	518	520	530	532	534	536
H4H14813N	538	540	542	544	546	548	550	552
H4H17819P	554	556	558	560	562	564	566	568

[0060] A Tabela 1 apresenta os identificadores da sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia pesada (HCVRs), regiões variáveis de cadeia leve (LCVRs), regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e regiões

determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) dos anticorpos anti-LAG3 exemplares.

[0061] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácido selecionado de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência a esta.

[0062] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência a esta.

[0063] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma HCVR e um par de sequência de aminoácido de LCVR (HCVR/LCVR) compreendendo qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1 emparelhadas com qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1. De acordo com algumas modalidades, a presente descrição provê anticorpos ou fragmentos de ligação aos antígenos do mesmo, compreendendo um par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR contido dentro de qualquer um dos anticorpos anti-LAG3 exemplares listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, o par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR é selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218,

226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 e 554/562. Em algumas modalidades, a o par de sequências de aminoácido de HCVR/LCVR é selecionado de uma das SEQ ID NOs: 386/394 (por exemplo, H4sH15479P), 418/426 (por exemplo, H4sH15482P) ou 538/546 (por exemplo, H4sH14813N). Em algumas outras modalidades, o par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR é selecionado de uma das SEQ ID NOs: 458/464 (por exemplo, H4sH15498P2), 162/170 (por exemplo, H4H15483P) e 579/578 (por exemplo, H4H15482P).

[0064] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um CDR1 de cadeia pesada (HCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência.

[0065] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma CDR2 de cadeia pesada (HCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência.

[0066] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma

tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência.

[0067] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um CDR1 de cadeia leve (LCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência.

[0068] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma CDR2 de cadeia leve (LCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência.

[0069] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um CDR3 de cadeia leve (LCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência.

[0070] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um HCDR3 e um par de sequência de aminoácido de LCDR3 (HCDR3/LCDR3) compreendendo qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1 emparelhada com qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR3 listadas na Tabela 1. De acordo com algumas

modalidades, a presente descrição provê anticorpos ou fragmentos de ligação aos antígenos do mesmo, compreendendo um par de sequência de aminoácido de HCDR3/LCDR3 contido dentro de qualquer um dos anticorpos anti-LAG3 exemplares listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, o par de sequência de aminoácido de HCDR3/LCDR3 é selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 392/400 (por exemplo, H4sH15479P), 424/432 (por exemplo, H4sH15482P) e 544/552 (por exemplo, H4sH14813N).

[0071] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um conjunto de seis CDRs (por exemplo, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contidas dentro de qualquer um dos anticorpos anti-LAG3 listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, o conjunto de sequências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 é selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 388-390-392-396-398-400 (por exemplo, H4sH15479P), 420-422-424-428-430-432 (por exemplo, H4sH15482P) e 540-542-544-548-550-552 (por exemplo, H4sH14813N).

[0072] Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um conjunto de seis CDRs (por exemplo, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contido dentro de um par de sequência de aminoácidos de HCVR/LCVR como definido através de qualquer um dos anticorpos anti-LAG3 exemplares listados na Tabela 1. Por exemplo, em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo a conjunto de sequência de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contido dentro de um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 386/394 (por exemplo, H4sH15479P), 418/426 (por exemplo, H4sH15482P) e 538/546 (por exemplo, H4sH14813N). Os métodos e técnicas para identificar as CDRs dentro das sequências de aminoácidos de

HCVR e LCVR são bem conhecidos na técnica e podem ser usados para identificar as CDRs dentro das sequências de aminoácidos de HCVR e/ou LCVR especificadas aqui divulgadas. As convenções exemplares que podem ser usadas para identificar os limites das CDRs incluem, por exemplo, a definição de Kabat, a definição de Chothia e a definição de AbM. Em termos gerais, a definição de Kabat tem base na variabilidade de sequência, a definição de Chothia tem base no local das regiões de alça estrutural e a definição de AbM é um compromisso entre os métodos de Kabat e Chothia. Ver, por exemplo, Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); e Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Os bancos de dados públicos também estão disponíveis para identificar as sequências de CDR dentro de um anticorpo.

[0073] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação são anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que competem pela ligação específica ao LAG3 com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e LCVR têm cada uma, uma sequência de aminoácido selecionada das sequências de HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[0074] Os anticorpos anti-LAG3 exemplares adicionais aqui úteis incluem LAG525 (e outros anticorpos LAG3 divulgados na U.S. 20100233183), relatlimab (e outros anticorpos de LAG3 divulgados na U.S. 20110150892), GSK2831781 (e outros anticorpos de LAG3 divulgados na U.S. 20140286935), MGD013 (e outros anticorpos de LAG3 divulgados na WO2015200119) e os anticorpos de LAG3 divulgados na U.S. 20160222116, U.S. 20170022273, U.S. 20170097333, U.S. 20170137517, U.S. 20170267759, U.S. 20170290914, U.S. 20170334995, WO2016126858, WO2016200782, WO2017087589, WO2017087901, WO2017106129,



WO2017149143, WO2017198741, WO2017219995 e WO2017220569.

[0075] Também são aqui providos os anticorpos isolados e fragmentos de ligação aos antígenos do mesmo que bloqueiam a ligação de LAG3 ao MHC classe II. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que bloqueia a ligação de LAG3 pode ligar ao mesmo epítipo em LAG3 como MHC classe II ou pode ligar a um epítipo diferente na LAG3 como MHC classe II. Em algumas modalidades, os anticorpos da descrição que bloqueiam a ligação de LAG3 ao MHC classe II compreende as CDRs de uma HCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de HCVR listadas na Tabela 1; e as CDRs de uma LCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de LCVR listadas na Tabela 1.

[0076] Nas modalidades alternadas, a presente descrição provê anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que não bloqueiam a ligação de LAG3 ao MHC classe II.

[0077] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação são anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que ligam especificamente ao LAG3 de um ser humano ou outra espécie. Em algumas modalidades, os anticorpos podem ligar ao LAG3 humano e/ou ao LAG3 de cinomolgo.

[0078] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação são anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que competem em cruzado pela ligação ao LAG3 com um anticorpo de referência ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e LCVR têm cada uma, uma sequência de aminoácido selecionada das sequências de HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[0079] Em uma modalidade, a proteína de ligação é um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno que tem uma ou mais das

seguintes características: (a) bloqueia a ligação de LAG3 ou ao MHC classe II; (b) liga especificamente ao LAG3 humano e/ou LAG3 de cinomolgo; (c) bloqueia o dano induzido por LAG3 da ativação da célula T e resgata a sinalização da célula T; e (d) inibe o crescimento tumoral e aumenta a sobrevivência em um sujeito com câncer.

[0080] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ligar especificamente ao LAG3 de uma maneira agonística, por exemplo, estes podem aumentar ou estimular a ligação e/ou atividade de LAG3; em outras modalidades, o anticorpo pode ligar especificamente ao LAG3 de uma maneira antagonista, por exemplo, este pode bloquear LAG3 da ligação ao seu ligante.

[0081] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ligar especificamente ao LAG3 em uma maneira natural, por exemplo, estes ligam, mas não bloqueiam, aumentam ou estimulam a ligação e/ou atividade LAG3.

[0082] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação aos antígenos são biespecíficos compreendendo uma primeira especificidade de ligação ao LAG3 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo. O segunda epítipo alvo pode ser outro epítipo em LAG3 ou em uma proteína diferente. Em algumas modalidades, o segundo epítipo alvo pode estar em uma célula diferente, incluindo uma célula T diferente, uma célula B, uma célula tumoral ou uma célula viralmente infectada.

[0083] Em algumas modalidades, um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é provido o qual liga especificamente à proteína do gene de ativação do linfócito humano 3 (LAG3), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem uma propriedade selecionada do grupo consistindo em: (a) liga LAG3 monomérico humano com uma constante de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) de

menos do que cerca de 10 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C (usando o formato do ensaio como definido no exemplo 3 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar); (b) liga o LAG3 monomérico humano com uma  $K_D$  menor do que cerca de 8nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37 °C; (c) liga o LAG3 humano dimérico com uma  $K_D$  menor do que cerca de 1,1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25°C; (d) liga o LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  menor do que cerca de 1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37 °C; (e) liga a uma célula que expressa hLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 8 nM como medido em um ensaio citométrico de fluxo; (f) liga a uma célula que expressa mfLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 2,3 nM como medido em um ensaio de citometria de fluxo; (g) bloqueia a ligação do hLAG3 ao MHC humano classe II com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 32 nM como determinado por um ensaio de aderência celular; (h) bloqueia a ligação de hLAG3 ao MHC de camundongo classe II com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 30 nM como determinado por um ensaio de aderência celular; (i) bloqueia a ligação de hLAG3 à MHC classe II em mais do que 90 % como determinado por um ensaio de aderência celular; (j) resgata a inibição mediada por LAG3 da atividade da célula T com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 9 nM como determinado em um ensaio repórter de luciferase; e (k) liga às células T CD4+ e CD8+ ativadas com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 1,2 nM, como determinado em um ensaio de fluorescência.

[0084] Em algumas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam ao LAG3 com uma meia vida dissociativa ( $t_{1/2}$ ) de mais do que cerca de 1,6 minutos como medido pela ressonância plasmônica de superfície a 25° C ou 37° C, por exemplo, usando um formato de ensaio como definido no exemplo 3 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos

ou fragmentos de ligação ao antígenos ligam à LAG3 com uma  $t_{1/2}$  de mais do que cerca de 5 minutos, mais do que cerca de 10 minutos, mais do que cerca de 30 minutos, mais do que cerca de 50 minutos, mais do que cerca de 60 minutos, mais do que cerca de 70 minutos, mais do que cerca de 80 minutos, mais do que cerca de 90 minutos, mais do que cerca de 100 minutos, mais do que cerca de 200 minutos, mais do que cerca de 300 minutos, mais do que cerca de 400 minutos, mais do que cerca de 500 minutos, mais do que cerca de 600 minutos, mais do que cerca de 700 minutos, mais do que cerca de 800 minutos, mais do que cerca de 900 minutos, mais do que cerca de 1000 minutos ou mais do que cerca de 1100 minutos, como medido pela ressonância plasmônica de superfície a 25° C ou 37° C, por exemplo, usando um formato de ensaio como definido no exemplo 3 da PCT/US16/56156 (por exemplo, captura de mAb ou formato de captura do antígeno) ou um ensaio substancialmente similar.

[0085] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam a uma célula expressando o LAG3 humano com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 8 nM como medido através de um ensaio de citometria de fluxo como definido no exemplo 5 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam a uma célula expressando ihLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 5 nM, menor do que cerca de 2 nM, menor do que cerca de 1 nM ou menor do que cerca de 0,5 nM, como medido por um ensaio de citometria de fluxo, por exemplo, usando o formato de ensaio no exemplo 5 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0086] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam a uma célula que expressa LAG3 de macaco cinomolgo com uma menor  $EC_{50}$  do que cerca de 2,5 nM como medido através de um ensaio de citometria de fluxo como definido no

exemplo 5 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam a uma célula que expressa mLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 2 nM ou menor do que cerca de 1 nM, como medido através de um ensaio de citometria de fluxo, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no exemplo 5 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0087] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo bloqueiam a ligação ao MHC classe II (por exemplo, HLA-DR2 humano) com uma  $IC_{50}$  de menos do que cerca de 32 nM como determinado usando um ensaio de aderência celular, por exemplo, como mostrado no exemplo 7 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação aos antígenos do mesmo bloqueiam a ligação de LAG3 ao MHC classe II humano com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 25 nM, menor do que cerca de 20 nM, menor do que cerca de 10 nM ou menor do que cerca de 5 nM, como medido por um ensaio de aderência celular, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no exemplo 7 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0088] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo bloqueiam a ligação de LAG3 ao MHC classe II com uma  $IC_{50}$  de menos do que cerca de 30 nM como determinado usando um ensaio de aderência celular, por exemplo, como mostrado no exemplo 7 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação aos antígenos do mesmo bloqueia a ligação de LAG3 de camundongo à MHC humana classe II com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 25 nM, menor do que cerca de 20 nM, menor do que cerca de 10 nM ou menor do que cerca de 5 nM, como medido através de um ensaio de aderência celular, por exemplo, usando o formato de ensaio

como definido no exemplo 7 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0089] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo bloqueia a ligação de LAG3 à MHC humana ou de camundongo classe II em mais do que 90 % como medido por um ensaio de aderência celular como definido no exemplo 7 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0090] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo bloqueiam a infrarregulação da célula T induzida por LAG com uma  $EC_{50}$  menor do que 9 nM como medido por um ensaio repórter de célula T/APC luciferase como definido no exemplo 8 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo bloqueiam a infrarregulação da célula T induzida por LAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 5 nM, menor do que cerca de 1 nM, menor do que cerca de 0,5 nM ou menor do que cerca de 0,1 nM, como medido por um ensaio repórter de célula T/APC luciferase, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no exemplo 8 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0091] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam às células T CD4+ e CD8+ ativadas de cinomolgo com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 1,2 nM como medido através de um ensaio de fluorescência como definido no exemplo 9 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam às células T CD4+ e CD8+ ativadas de cinomolgo com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 1,1 nM, menor do que cerca de 1 nM, menor do que cerca de 0,5 nM, menor do que cerca de 0,2 nM ou menor do que cerca de 0,1 nM, como medido por um ensaio de fluorescência, por exemplo, usando o

formato de ensaio como definido no exemplo 9 da PCT/US16/56156 ou um ensaio substancialmente similar.

[0092] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo é um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga ao LAG3, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo apresenta uma ou mais das seguintes características: (i) compreende uma HCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 e 554 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (ii) compreende uma LCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 e 562 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (iii) compreende um domínio de HCDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 e 560 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; e um domínio de LCDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 e 568 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98

% ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (iv) compreende um domínio de HCDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo da SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 e 556 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; um domínio de HCDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 e 558 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; um domínio de LCDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 e 564 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; e um domínio de LCDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 e 566 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (v) liga LAG3 monomérico humano com uma constante de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) de menos do que cerca de 10 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C; (vi) liga LAG3 monomérico humano com uma  $K_D$  menor do que cerca de 8 nM como medido em um



ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37° C; (vii) liga LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  menor do que cerca de 1,1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C; (viii) liga LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  menor do que cerca de 1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37° C; (ix) liga a uma célula expressando ihLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 8 nM como medido em um ensaio de citometria de fluxo; (x) liga a uma célula expressando mfLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 2,3 nM como medido em um ensaio de citometria de fluxo; (xi) bloqueia a ligação de hLAG3 ao MHC humano classe II com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 32 nM como determinado por um ensaio de aderência celular; (xii) bloqueia a ligação de hLAG3 ao camundongo MHC classe II com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 30 nM como determinado por um ensaio de aderência celular; (xiii) bloqueia a ligação de hLAG3 ao MHC classe II em mais do que 90 % como determinado por um ensaio de aderência celular; (xiv) resgata a inibição mediada por LAG3 da atividade da célula T com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 9 nM como determinado em um ensaio repórter de luciferase; (xv) liga às células T CD4+ e CD8+ ativadas com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 1,2 nM, como determinado em um ensaio de fluorescência; e (xvi) inibe o crescimento tumoral e aumenta a sobrevivência em um paciente com câncer.

[0093] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo é um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que bloqueia o LAG3 ligando ao MHC classe II, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo apresenta uma ou mais das seguintes características: (i) compreende uma HCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 e 554 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo

menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (ii) compreende uma LCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 e 562 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (iii) compreende um domínio de HCDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 e 560 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; e um domínio de LCDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 e 568 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (iv) compreende um domínio de HCDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 e 556 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; um domínio de HCDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478,

486, 494, 502, 510, 518, 542 e 558 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; uma domínio de LCDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 e 564 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; e um domínio de LCDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 e 566 ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % de identidade de sequência; (v) liga LAG3 monomérico humano com uma constante de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) de menos do que cerca de 10 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C; (vi) liga LAG3 monomérico humano com uma  $K_D$  menor do que cerca de 8 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37° C; (vii) liga LAG3 humano dimérico com uma  $K_D$  menor do que cerca de 1,1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C; (viii) liga LAG3 humano dimérico com uma  $K_D$  menor do que cerca de 1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37° C; (ix) liga a um célula expressando ihLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 8 nM como medido em um ensaio de citometria de fluxo; (x) liga a uma célula que expressa mfLAG3 com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 2,3 nM como medido em um ensaio de citometria de fluxo; (xi) bloqueia a ligação de hLAG3 à MHC humana classe II com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 32 nM como determinado por um ensaio de aderência celular; (xii)

bloqueia a ligação de hLAG3 ao MHC classe II de camundongo com uma  $IC_{50}$  menor do que cerca de 30 nM como determinado por um ensaio de aderência celular; (xiii) bloqueia a ligação de hLAG3 para o MHC classe II em mais do que 90 % como determinado por um ensaio de aderência celular; (xiv) resgata a inibição mediada por LAG3 da atividade da célula T com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 9 nM como determinado em um ensaio repórter de luciferase; (xv) liga às células T CD4+ e CD8+ ativadas com uma  $EC_{50}$  menor do que cerca de 1,2 nM, como determinado em um ensaio de fluorescência; e (xvi) inibe o crescimento tumoral e aumenta a sobrevivência em um sujeito com câncer.

[0094] Em algumas modalidades, os anticorpos podem funcionar bloqueando-se ou inibindo-se a atividade de ligação de MHC classe II associada com LAG3 ligando-se a qualquer outra região ou fragmento da proteína de cadeia longa, a sequência de aminoácido a qual é mostrada na SEQ ID NO: 582.

[0095] Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos podem ligar um epítopo em um domínio e também pode ligar um segundo epítopo em um diferente domínio do LAG3. Em algumas modalidades, os anticorpos biespecíficos ligam dois diferentes epítopos no mesmo domínio. Em uma modalidade, a molécula de ligação ao antígeno multiespecífica compreende uma primeira especificidade de ligação ao antígeno em que a primeira especificidade de ligação compreende o domínio ou fragmento extracelular do mesmo do LAG3; e uma segunda especificidade de ligação ao antígeno a um outro epítopo do LAG3.

[0096] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-LAG3 ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ligam um epítopo dentro de qualquer uma ou mais das regiões exemplificadas no LAG3, na forma natural, como exemplificado na SEQ ID NO: 582 ou recombinantemente produzido, como exemplificado nas SEQ ID NOS: 574 a 576 ou a um fragmento do

mesmo. Em algumas modalidades, os anticorpos ligam a uma região extracelular compreendendo uma ou mais aminoácidos selecionados do grupo consistindo em 29 a 450 resíduos de aminoácido de LAG3. Em algumas modalidades, os anticorpos ligam a uma região extracelular compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados do grupo consistindo em 1 a 533 resíduos de aminoácido do LAG3 cinomolgo, como exemplificado pela SEQ ID NO: 576.

[0097] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-LAG3 e os fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo interagem com um ou mais epítopos encontrados dentro da região extracelular de LAG3 (SEQ ID NO: 588). O(s) epítipo(s) podem consistir em uma ou mais sequências contíguas de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos localizados dentro da região extracelular de LAG3. Alternativamente, o epítipo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequência de aminoácidos) localizados dentro da região extracelular de LAG3. O epítipo de LAG3 com o qual o anticorpo H4sH15482P exemplar interage é definido pela sequência de aminoácido LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 589), que corresponde aos aminoácidos de 28 a 71 da SEQ ID NO: 588. Portanto, também são incluídos os anticorpos anti-LAG3 que interagem com um ou mais aminoácidos contidos dentro da região consistindo em aminoácidos de 28 a 71 da SEQ ID NO: 588 (por exemplo, a sequência LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY [SEQ ID NO: 589]).

[0098] A presente descrição inclui os anticorpos anti-LAG3 que ligam ao mesmo epítipo ou uma porção do epítipo, como qualquer um dos anticorpos exemplares específicos aqui descritos na Tabela 1 ou um anticorpo tendo as sequências CDR de qualquer um dos anticorpos exemplares descritos na Tabela 1. Do mesmo mofo, também são incluídos os anticorpos anti-LAG3

que competem pela ligação ao LAG3 ou um fragmento de LAG3 com qualquer um dos anticorpos exemplares específicos aqui descritos na Tabela 1 ou um anticorpo tendo as sequências de CDR de qualquer um dos anticorpos exemplares descritos na Tabela 1. Por exemplo, a presente descrição inclui os anticorpos anti-LAG3 que competem em cruzado para a ligação a LAG3 com um ou mais anticorpos aqui providos (por exemplo, H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P, H4sH15498P, H4H15498P, H4H17828P2, H4H17819P e H4H17823P).

[0099] Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos especificamente ligam ao LAG3 e modulam a interação de LAG3 com MHC classe II. Os anticorpos anti-LAG3 podem ligar ao LAG3 com alta afinidade ou com baixa afinidade. Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos de bloqueio em que os anticorpos ligam ao LAG3 e bloqueiam a interação de LAG3 com MHC classe II. Em algumas modalidades, os anticorpos de bloqueio da descrição bloqueiam a ligação de LAG3 ao MHC classe II e/ou estimulam ou aumentam a ativação da célula T. Em algumas modalidades, os anticorpos de bloqueio são úteis para estimular ou aumentar a resposta imune e/ou para tratar um sujeito sofrendo de câncer ou uma infecção viral crônica. Os anticorpos quando administrados a um sujeito em necessidade do mesmo podem reduzir a infecção crônica através de um vírus tal como vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus do papiloma humano (HPV), vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) e vírus da imunodeficiência de símios (SIV) no sujeito. Estes podem ser usados para inibir o crescimento das células tumorais em um sujeito. Estas podem ser usadas sozinhas ou como a terapia auxiliar com outras porções terapêuticas ou modalidades conhecidas na técnica para tratar câncer ou infecção viral. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-LAG3 que ligam ao LAG3 com uma baixa afinidade são

usados como moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas em que a primeira especificidade de ligação liga ao LAG3 com uma baixa afinidade e a segunda especificidade de ligação liga a um antígeno selecionado do grupo consistindo em um epítipo diferente do LAG3 e um outro coinibidor da célula T.

[00100] Em algumas modalidades, os anticorpos ligam ao LAG3 e reverterem o estado anérgico das células T exauridas. Em algumas modalidades, os anticorpos ligam ao LAG3 e inibem a atividade reguladora da célula T. Em algumas modalidades, os anticorpos podem ser úteis para estimular ou aumentar a resposta imune e/ou para tratar um sujeito que sofre de câncer, uma infecção viral, uma infecção bacteriana, uma infecção fúngica ou uma infecção parasítica. Os anticorpos quando administrados a um sujeito em necessidade do mesmo podem reduzir a infecção crônica através de um vírus tal como HIV, LCMV ou HBV no sujeito. Estes podem ser usados para inibir o crescimento das células tumorais em um sujeito. Estes podem ser usados sozinhos ou como uma terapia auxiliar com outras porções terapêuticas ou modalidades conhecidas na técnica para tratar o câncer ou infecção viral.

[00101] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente descrição são anticorpos agonistas, em que os anticorpos ligam à LAG3 e aumentam a interação de LAG3 e MHC classe II. Em algumas modalidades, os anticorpos de ativação aumentam a ligação de LAG3 ao MHC classe II e/ou inibem ou suprimem a ativação da célula T. Os anticorpos de ativação da presente descrição podem ser úteis para inibir a resposta imunológica em um sujeito e/ou para tratar a doença autoimune.

[00102] Alguns anticorpos anti-LAG3 são capazes de ligar a e neutralizar a atividade de LAG3, como determinado por ensaio *in vitro* ou *in vivo*. A capacidade dos anticorpos de ligar a e neutralizar a atividade do LAG3 pode ser medida usando qualquer método padrão conhecido por aqueles versados na técnica, incluindo os ensaios de ligação ou os ensaios de

atividade, como aqui descritos.

[00103] Os ensaios exemplares *in vitro* não limitantes, para medir a atividade de ligação são ilustrados nos exemplos providos na PCT/US16/56156: no exemplo 3, as afinidades de ligação e as constantes cinéticas dos anticorpos anti-LAG3 humano para o LAG3 humano foram determinados através da ressonância plasmônica de superfície e as medições foram conduzidas em um instrumento Biacore 4000 ou T200; no exemplo 4, os ensaios de bloqueio foram usados para determinar a competição em cruzado entre os anticorpos anti-LAG3; os exemplos 5 e 6 descrevem a ligação dos anticorpos às células que superexpressam LAG3; no exemplo 7, os ensaios de ligação foram usados para determinar a capacidade dos anticorpos anti-LAG3 para bloquear a capacidade de ligação ao MHC classe II do LAG3 *in vitro*; no exemplo 8, um ensaio de luciferase foi usado para determinar a capacidade dos anticorpos anti-LAG3 de antagonizar a sinalização de LAG3 nas células T; e no exemplo 9, um ensaio de fluorescência foi usado para determinar a capacidade dos anticorpos anti-LAG3 de ligar às células T CD4+ e CD8+ ativadas de macacos.

[00104] A menos que especificamente indicado de outra forma, o termo “anticorpo,” como aqui usado, deve ser entendido abranger as moléculas de anticorpo compreendendo duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina (por exemplo, “moléculas de anticorpo completas”) bem como os fragmentos de ligação ao antígeno da mesma. Os termos “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo, “fragmento de ligação ao antígeno” de um anticorpo e outros, como aqui usado, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtenível, sintético ou geneticamente engenheirado que especificamente liga um antígeno para formar um complexo. Os termos “fragmentos de ligação ao antígeno” de um anticorpo ou “fragmento de anticorpo”, como aqui usados, se referem a um ou mais



fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de ligar especificamente à LAG3. Um fragmento de anticorpo pode incluir um fragmento de Fab, um fragmento de F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv, um fragmento dAb, um fragmento contendo uma CDR ou uma CDR isolada. Em algumas modalidades, o termo “fragmento de ligação ao antígeno” se refere a um polipeptídeo ou fragmento do mesmo de uma molécula de ligação ao antígeno multiespecífico. Em tais modalidades, o termo “fragmento de ligação ao antígeno” inclui, por exemplo, a molécula MHC classe II que liga especificamente ao LAG3. Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de uma molécula de anticorpos total usando qualquer técnica padrão adequada tal como uma digestão proteolítica ou técnicas de engenharia genética recombinante envolvendo a manipulação e expressão do anticorpo que codifica os domínios de DNA variáveis e (opcionalmente) constantes. Tal DNA é conhecido e/ou é prontamente disponível de, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo) ou podem ser sintetizadas. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou usando-se técnicas de biologia molecular, por exemplo, para arranjar uma ou mais variáveis e/ou domínios constantes em uma configuração adequada ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou excluir aminoácidos, etc.

[00105] Os exemplos não limitantes de fragmentos de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos de Fab; (ii) fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>; (iii) fragmentos de Fd; (iv) fragmentos de Fv; (v) moléculas de Fv de cadeia simples (scFv); (vi) fragmentos de dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimas, consistindo dos resíduos de aminoácido que imitam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região que determina complementariedade (CDR) isolada, tal como um peptídeo de CDR3) ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 constrangido. Outras moléculas engenheiradas, tais como os anticorpos de domínio específico, anticorpos de domínio único,

anticorpos de domínio excluído, anticorpos quiméricos, anticorpos com CDR enxertada, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (por exemplo nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes, etc.), produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs) e domínios IgNAR variáveis de tubarão, também estão abrangidos dentro da expressão “fragmento de ligação ao antígeno,” como aqui usado.

[00106] Um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo tipicamente compreenderá pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácido e geralmente compreenderá pelo menos uma CDR, que é adjacente a ou na armação com uma ou mais sequências de estrutura. Nos fragmentos de ligação ao antígeno tendo um domínio de  $V_H$  associado com um domínio  $V_L$ , os domínios  $V_H$  e  $V_L$  podem ser situados com relação uns aos outros em qualquer arranjo adequado. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros  $V_H - V_H$ ,  $V_H - V_L$  ou  $V_L - V_L$ . Alternativamente, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter um domínio  $V_H$  ou  $V_L$  monomérico.

[00107] Em algumas modalidades, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável covalentemente ligado a pelo menos um domínio constante. As configurações exemplares não variantes dos domínios variáveis e constantes que podem ser encontrados dentro de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente descrição incluem: (i)  $V_H - C_H1$ ; (ii)  $V_H - C_H2$ ; (iii)  $V_H - C_H3$ ; (iv)  $V_H - C_H1 - C_H2$ ; (v)  $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$ ; (vi)  $V_H - C_H2 - C_H3$ ; (vii)  $V_H - C_L$ ; (viii)  $V_L - C_H1$ ; (ix)  $V_L - C_H2$ ; (x)  $V_L - C_H3$ ; (xi)  $V_L - C_H1 - C_H2$ ; (xii)  $V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3$ ; (xiii)  $V_L - C_H2 - C_H3$ ; e (xiv)  $V_L - C_L$ . Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer uma das configurações exemplares acima listadas, os domínios variáveis e constantes podem ser diretamente ligados uns aos outros ou podem ser ligados a qualquer região de dobradiça

ou ligante total ou parcial. Uma região de dobradiça pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos, que resulta em uma ligação flexível ou semiflexível entre os domínios variáveis e/ou constantes adjacentes em uma molécula de polipeptídeo única. Além disso, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente descrição pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma das configurações de domínio variável e constante listadas acima em associação não covalente uns com os outros e/ou com uma ou mais domínios V<sub>H</sub> ou V<sub>L</sub> monoméricos (por exemplo, através da(s) ligação(ões) de dissulfeto).

[00108] Como com as moléculas de anticorpos inteiras, os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos). Um fragmento de ligação ao antígeno multiespecífico de um anticorpo tipicamente compreenderá pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de especificamente ligar a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpo biespecíficos exemplares aqui divulgados, podem ser adaptados para o uso no contexto de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente descrição usando técnicas de rotina disponíveis na técnica.

[00109] Os anticorpos anti-LAG3 e os fragmento de anticorpos da presente descrição abrangem as proteínas tendo as sequências de aminoácidos que variam daquelas dos anticorpos descritos, mas que retêm a capacidade de ligar LAG3. Tais anticorpos variantes e fragmentos de anticorpos compreendem uma ou mais adições, exclusões ou substituições de aminoácidos quando comparados à sequência precursora, mas apresentam uma atividade biológica que é essencialmente equivalente àquela dos anticorpos descritos. Do mesmo modo, as sequências que codificam anticorpo

do DNA da presente descrição abrangem as sequências que compreendem uma ou mais adições, exclusões ou substituições dos nucleotídeos se comparado à sequência divulgada, mas que codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo ou fragmento de anticorpo da descrição.

[00110] Duas proteínas de ligação ao antígeno ou anticorpos, são consideradas bioequivalentes se, por exemplo, estas são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e grau de absorção não apresentam uma diferença significativa quando administrados na mesma dose molar sob condições experimentais similares, em dose única ou doses múltiplas. Alguns anticorpos serão considerados equivalentes ou alternativas farmacêuticas se estes são equivalentes no grau de sua absorção mas não na sua taxa de absorção e ainda podem ser considerados bioequivalentes porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na rotulação, não são essenciais para a obtenção das concentrações de fármaco eficazes no corpo, por exemplo, uso crônico e considerados insignificantes do ponto de vista médico para o produto de fármaco particular estudado.

[00111] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se não existem diferenças clinicamente significantes na sua segurança, pureza ou potência.

[00112] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se um paciente pode ter o fármaco trocado uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma mudança clinicamente significativa na imunogenicidade ou eficácia diminuída, se comparado à terapia continuada sem tal troca.

[00113] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação aos antígenos são bioequivalentes se ambas agem através de um mecanismo comum ou mecanismos de ação para a condição ou condições de uso, até o grau em que

tais mecanismos sejam conhecidos.

[00114] A bioequivalência pode ser demonstrada através de métodos *in vivo* e/ou *in vitro*. As medidas de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, em que a concentração do anticorpo ou seus metabólitos é medido no sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico como uma função de tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado e é razoavelmente preditivo de dados de biodisponibilidade humana *in vivo*; (c) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos em que o efeito farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou seu alvo) é medido como uma função de tempo; e (d) em um teste clínico bem controlado que estabelece segurança, eficácia ou biodisponibilidade ou bioequivalência de um anticorpo.

[00115] As variantes bioequivalentes dos anticorpos da descrição podem ser construídas, por exemplo, fazendo-se várias substituições de resíduos ou sequências ou excluindo os resíduos terminais ou internos ou as sequências não necessárias para a atividade biológica. Por exemplo, os resíduos de cisteína não essenciais para a atividade biológica podem ser excluídos ou substituídos com outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes de dissulfeto intramoleculares não necessárias ou incorretas na renaturação. Em outros contextos, os anticorpos bioequivalentes podem incluir variantes de anticorpo compreendendo mudanças de aminoácidos, que modificam as características de glicosilação dos anticorpos, por exemplo, mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

[00116] De acordo com algumas modalidades da presente descrição, os anticorpos anti-LAG3 compreendem um domínio Fc compreendendo uma ou mais mutações que aumentam ou diminuem a ligação de anticorpo ao receptor de FcRn, por exemplo, no pH ácido se comparado ao pH neutro. Por exemplo, a presente descrição inclui os anticorpos anti-LAG3 compreendendo uma mutação na região C<sub>H</sub>2 ou C<sub>H</sub>3 do domínio Fc, em que a(s) mutação(ões)

aumenta(m) a afinidade do domínio Fc para FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossoma onde o pH varia de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento na meia vida do soro no anticorpo quando administrado a um animal. Os exemplos não limitantes de tais modificações de Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo e ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T) e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, A, W, H, F ou Y [N434A, N434W, N434H, N434F ou N434Y]); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F) e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação em 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação em 428L, 259I (por exemplo, V259I) e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação em 433K (por exemplo, H433K) e uma modificação em 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação em 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação em 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação em 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P). Ainda em outra modalidade, a modificação compreende uma modificação em 265A (por exemplo, D265A) e/ou um 297A (por exemplo, N297A).

[00117] Por exemplo, a presente descrição inclui anticorpos anti-LAG3 compreendendo um domínio Fc compreendendo um ou mais pares ou grupos de mutações selecionadas do grupo consistindo em: 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); 257I e 311I (por exemplo, P257I e Q311I); 257I e 434H (por exemplo, P257I e N434H); 376V e 434H (por exemplo, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (por exemplo, T307A, E380A e N434A); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e

N434F). Em uma modalidade, a presente descrição inclui anticorpos anti-LAG3 compreendendo um domínio de Fc compreendendo uma mutação S108P na região de dobradiça de IgG4 para promover a estabilização dimérica. Todas as combinações possíveis das mutações do domínio de Fc anteriores e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpo aqui divulgados, são consideradas dentro do escopo da presente descrição.

[00118] A presente descrição também inclui anticorpos anti-LAG3 compreendendo uma região constante de cadeia pesada quimérica ( $C_H$ ), em que a região quimérica  $C_H$  compreende segmentos derivados das regiões de  $C_H$  de mais do que um isótipo de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos da descrição podem compreender uma região  $C_H$  quimérica compreendendo parte ou todo de um domínio  $C_{H2}$  derivado de uma molécula IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinado com parte ou todo de um domínio  $C_{H3}$  derivado de uma molécula IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. De acordo com algumas modalidades, os anticorpos da descrição compreendem uma região  $C_H$  quimérica tendo uma região de dobradiça quimérica. Por exemplo, uma dobradiça quimérica pode compreender uma sequência de aminoácido de “dobradiça superior” (resíduos de aminoácido das posições 216 a 227 de acordo com a numeração EU) derivada de uma região de dobradiça de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinada com uma sequência de “dobradiça inferior” (resíduos de aminoácido das posições 228 a 236 de acordo com a numeração EU) derivada de uma região de dobradiça de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. De acordo com algumas modalidades, a região de dobradiça quimérica compreende os resíduos de aminoácido derivados de uma dobradiça superior de IgG1 humana ou IgG4 humana e resíduos de aminoácidos derivados de uma dobradiça de IgG2 humana inferior. Um anticorpo compreendendo uma região  $C_H$  quimérica como aqui descrito pode, em algumas modalidades, apresentar funções efetoras Fc sem afetar adversamente as propriedades

terapêuticas ou farmacocinéticas do anticorpo. (Ver, por exemplo, a Publicação de Patente US No. 20140243504, descrição a qual é aqui incorporada por referência na sua totalidade). Em algumas modalidades, a região de Fc compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 569, 570, 571, 572 e 573.

## **B. Emissores de pósitron e Porções quelantes**

[00119] Os emissores de pósitron adequados incluem, mas não são limitados àqueles que formam complexos estáveis com a porção quelante e têm meias vidas físicas adequadas para os propósitos de imageamento de imuno-PET. Os emissores de pósitron ilustrativos incluem, mas não são limitados a  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  e  $^{86}\text{Y}$ . Os emissores de pósitrons adequados também incluem aqueles que ligam diretamente com a proteína de ligação LAG3, incluindo, mas não limitado a  $^{76}\text{Br}$  e  $^{124}\text{I}$  e aqueles que são introduzidos por intermédio do grupo prostético, por exemplo,  $^{18}\text{F}$ .

[00120] As porções quelantes aqui descritas são porções químicas que são covalentemente ligadas à proteína de ligação de LAG3, por exemplo, o anticorpo anti-LAG3 e compreende uma porção capaz de quelar um emissor de pósitron, por exemplo, capaz de reagir com um emissor de pósitron para formar um complexo quelado coordenado. As porções adequadas incluem aquelas que permitem uma carga eficiente do metal particular e formam complexos de metal-quelador que são suficientemente estáveis *in vivo* para os usos de diagnóstico, por exemplo, imageamento de imuno-PET. As porções quelantes ilustrativas incluem aquelas que minimizam a dissociação do emissor de pósitron e o acúmulo em osso mineral, proteínas plasmáticas, e/ou medula óssea depositando até um grau adequado para usos de diagnóstico.

[00121] Os exemplos de porções quelantes incluem, mas não são limitados àqueles que formam complexos estáveis com emissores de pósitrons  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  e/ou  $^{86}\text{Y}$ . As porções quelantes ilustrativas incluem, mas não são limitadas àqueles descritas em *Nature Protocols*, 5(4): 739,



2010; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); *Chem Commun (Camb)*, 51(12): 2301 (2015); *Mol. Pharmaceuticals*, 12: 2142 (2015); *Mol. Imaging Biol.*, 18: 344 (2015); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 37:250 (2010); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); WO 2015/140212A1; e US 5.639.879, aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

[00122] As porções quelantes ilustrativas também incluem, mas não são limitadas àquelas que compreendem desferrioxamina (DFO), ácido 1,4,7,10-tetracético (DOTA), ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA), ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), ácido (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra(metileno fosfônico) (DOTP), 1R, 4R, 7R, 10R)-ácido  $\alpha'\alpha''\alpha'''$ -tetrametil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético (DOTMA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetracético (TETA), H<sub>4</sub>octapa, H<sub>6</sub>fospa, H<sub>2</sub>dedpa, H<sub>5</sub>decapa, H<sub>2</sub>azapa, HOPO, DO2A, 1,4,7,10-tetrakis(carbamoilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (DOTAM), ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA), 1,4,7,10-tetrakis(carbamoilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (DOTAM), ácido 1,4,8,11-tetraazabíciclo[6,6,2]hexadecano-4,11-dicético (CB-TE2A), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (ciclono), 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam), quelantes de octadentato, por exemplo, DFO\*, que pode ser conjugado ao anticorpo por intermédio de DFO\*-pPhe-NCS (Ver, Vugt *et al.*, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2017) 44: 286–295), quelantes de hexadentato, quelantes com base em fosfonato, quelantes macrocíclicos, quelantes compreendendo ligando de tereftalamida macrocíclica, quelantes bifuncionais, fusarinina C e quelantes derivados de fusarinina C, triacetilfusarinina C (TAFC), ferrioxamina E (FOX E), ferrioxamina B (FOX B), ferricromo A (FCHA) e os semelhantes.

[00123] Em algumas modalidades, as porções quelantes são covalentemente ligadas à proteína de ligação de LAG3, por exemplo,

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, por intermédio de uma porção ligadora, que covalentemente liga a porção quelante da porção quelante à proteína de ligação. Em algumas modalidades, estas porções ligadoras são formadas a partir de uma reação entre uma porção reativa da proteína de ligação LAG3, por exemplo, cisteína ou lisina de um anticorpo e a porção reativa que é ligada a um quelador, incluindo, por exemplo, um grupo p-isotiocianatobenzila e as porções reativas proveram os métodos de conjugação abaixo. Além disso, tais porções ligadoras opcionalmente compreendem os grupos químicos usados para os propósitos de ajustar a polaridade, solubilidade, interações estéricas, rigidez, e/ou o comprimento entre a porção quelante e a proteína de ligação de LAG3.

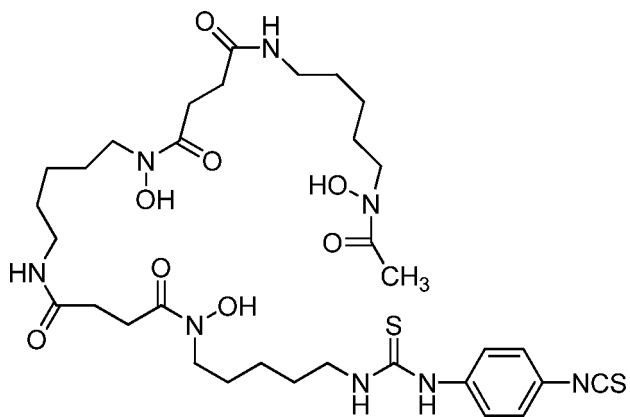
### **C. Preparação dos Conjugados de Anti-LAG3 Radiorrotulados**

[00124] Os conjugados de proteína anti-LAG3 radiorrotulados podem ser preparados através de (1) reagir uma proteína de ligação de LAG3, por exemplo, anticorpo, com uma molécula compreendendo um quelante emissor de pósitron e uma porção reativa ao local de conjugação desejado da proteína de ligação de LAG3 e (2) carregar o emissor de pósitron desejado.

[00125] Os locais de conjugação adequados incluem, mas são limitados a, lisina e cisteína, ambas as quais podem ser, por exemplo, nativas ou engenheiradas e podem, por exemplo, estar presentes na cadeia pesada ou leve de um anticorpo. Os locais de conjugação de cisteína incluem, mas não são limitados àqueles obtidos através da mutação, inserção ou redução das ligações de dissulfeto do anticorpo. Os métodos para fabricar os anticorpos engenheirados de cisteína incluem, mas não são limitados àqueles divulgados na WO2011/056983. Os métodos específicos de conjugação de local também podem ser usados para direcionar a reação de conjugação aos locais específicos de um anticorpo, obter a estequiometria desejável, e/ou obter as razões de quelante-para-anticorpo desejadas. Tais métodos de conjugação são conhecidos àqueles versados na técnica e incluem, mas não são limitados a

engenhramento de cisteínas e métodos enzimáticos e quimio-enzimáticos, incluindo, as não limitado a conjugação de glutamina, conjugação de Q295 e conjugação mediada por transglutaminase, bem aquelas descritas em *J. Clin. Immunol.*, 36: 100 (2016), aqui incorporada por referência na sua totalidade. As porções adequadas reativas ao local de conjugação desejável geralmente permitem a ligação eficaz e fácil da proteína de ligação de LAG3, por exemplo, quelante de anticorpo e emissor de pósitron. As porções reativas aos locais de lisina e cisteína incluem grupos eletrofílicos, que são conhecidos àqueles de habilidade comum. Em alguns aspectos, quando o local de conjugação desejado é lisina, a porção reativa é um isotiocianato, por exemplo, um grupo p-isotiocianatobenzila ou um éster reativo. Em alguns aspectos, quando o sítio de conjugação desejado é cisteína, a porção reativa é uma maleimida.

[00126] Quando o quelante é desferrioxamina (DFO), as porções reativas adequadas incluem, mas não são limitadas a, um grupo isotiociantatobenzila, um éster de n-hidroxisuccinimida, éster de 2,3,5,6 tetrafluorofenol, n-succinimidil-S-acetiltioacetato e aqueles descritos em *BioMed Research International*, Vol 2014, Article ID 203601, aqui incorporados por referência na sua totalidade. Em algumas modalidades, a proteína de ligação LAG3 é um anticorpo e a molécula compreendendo um quelante de emissor de pósitron e a porção reativa ao sítio de conjugação é p-isotiociantatobenzil-desferrioxamina (p-SCN-Bn-DFO):



[00127] A carga de emissor de pósitron é efetuada incubando-se o quelador de proteína de ligação LAG3 conjugado com o emissor de pósitron por um tempo suficiente para permitir a coordenação do dito emissor de pósitron ao quelador, por exemplo, realizando-se os métodos descritos nos exemplos aqui providos ou método substancialmente similar.

#### **D. Modalidades Ilustrativas dos Conjugados**

[00128] São incluídos na presente descrição os conjugados de anticorpos radiorrotulados compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga o LAG3 humano e um emissor de pósitron. Também são incluídos na presente descrição um conjugado de anticorpo radiorrotulado compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga o LAG3 humano, uma porção quelante e um emissor de pósitron.

[00129] Em algumas modalidades, a porção quelante compreende um quelante capaz de formar um complexo com  $^{89}\text{Zr}$ . Em algumas modalidades, a porção quelante compreende desferrioxamina. Em algumas modalidades, a porção quelante é p-isotiocianatobenzil-desferrioxamina.

[00130] Em algumas modalidades, o emissor de pósitron é  $^{89}\text{Zr}$ . Em algumas modalidades, menos do que 1,0 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,9 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,8 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,7 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,6 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,5 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,4 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,3 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron, menos do que 0,2 % do anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron ou menos do que 0,1 % do

anticorpo anti-LAG3 é conjugado com o emissor de pósitron.

[00131] Em algumas modalidades, a razão da porção quelante-para-anticorpo do conjugado é de 1 a 2.

[00132] Em uma modalidade particular, a porção quelante é p-isotiocianatobenzil-desferrioxamina e o emissor de pósitron é  $^{89}\text{Zr}$ . Em outra modalidade particular, a porção quelante é p-isotiocianatobenzil-desferrioxamina e o emissor de pósitron é  $^{89}\text{Zr}$  e a razão de porção quelante para anticorpo do conjugado é de 1 a 2.

[00133] Em algumas modalidades, são aqui providas as proteínas de ligação aos antígenos que ligam LAG3, em que as ditas proteínas de ligação aos antígenos que ligam LAG3 são covalentemente ligadas a uma ou mais porções tendo a seguinte estrutura:



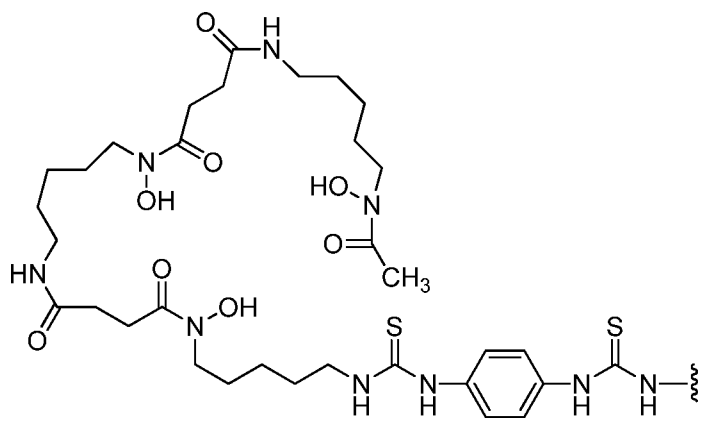
em que L é uma porção quelante; M é um emissor de pósitron; e z, independentemente em cada ocorrência, é 0 ou 1; e em que pelo menos um de z é 1. Em algumas modalidades, as proteínas radiorrotuladas de ligação ao antígeno são um composto da fórmula (I):



(I)

[00134] A é uma proteína que liga LAG3; L é uma porção quelante; M é um emissor de pósitron; z é 0 ou 1; e k é um número inteiro de 0 a 30. Em algumas modalidades, k é 1.

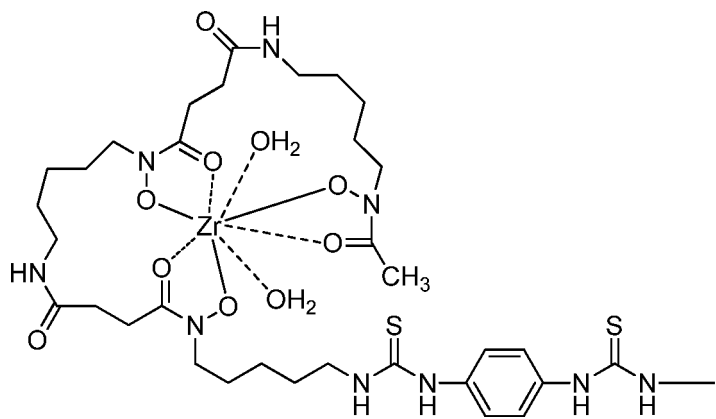
[00135] Em algumas modalidades, L é:



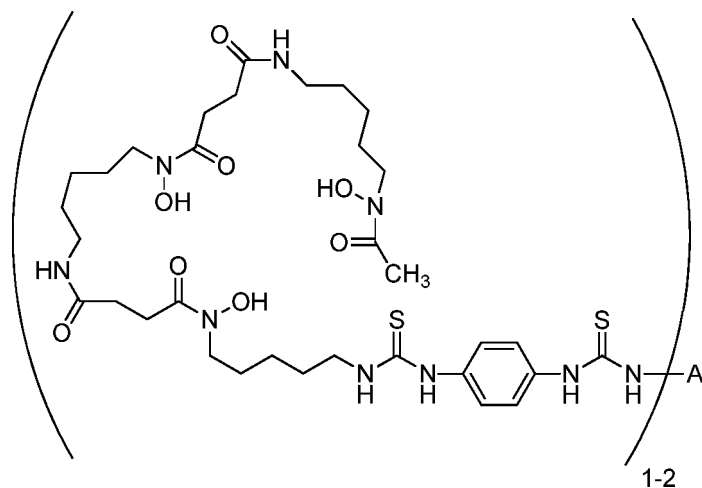
[00136] Em algumas modalidades, M é  $^{89}\text{Zr}$ .

[00137] Em algumas modalidades, k é um número inteiro de 1 a 2. Em algumas modalidades, k é 1.

[00138] Em algumas modalidades, -L-M é



[00139] Também estão incluídas na presente descrição os métodos de sintetizar um conjugado de anticorpo radiorrotulado compreendendo comunicar um composto da fórmula (III):

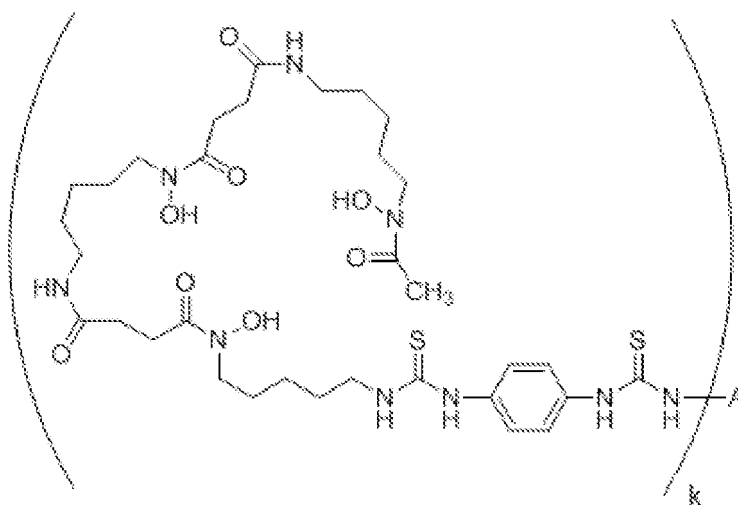


(III)

com  $^{89}\text{Zr}$ , em que A é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga LAG3. Em algumas modalidades, o composto da fórmula (III) é sintetizado comunicando-se um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que liga LAG3, com p-SCN-Bn-DFO.

[00140] Também é aqui provido o produto da reação entre um composto da fórmula (III) com  $^{89}\text{Zr}$ .

[00141] São aqui providos os compostos de fórmula (III):



em que A é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga LAG3 e k é um número inteiro de 1 a 30. Em algumas modalidades, k é 1 ou 2.

[00142] Em algumas modalidades, são aqui providas as composições compreendendo um conjugado tendo a seguinte estrutura:



em que A é uma proteína que liga LAG3; L é uma porção quelante; e k é um número inteiro de 1 a 30; em que o conjugado é quelado com um emissor de pósitron em uma quantidade suficiente para prover uma atividade específica adequada para o imageamento clínico de PET. Em algumas modalidades, a quantidade de quelado emissor de pósitron é uma quantidade suficiente para prover uma atividade específica de cerca de 1 a cerca de 20 mCi por 1 a 50 mg da proteína que liga LAG3. Em algumas modalidades, a quantidade do quelado emissor de pósitron é uma quantidade

suficiente para prover uma atividade específica de até 20 mCi, até 15 mCi ou até 10 mCi por 1 a 50 mg da proteína que liga LAG3, por exemplo, em uma faixa de cerca de 3 a cerca de 20 mCi, cerca de 5 a cerca de 20 mCi, cerca de 1 a cerca de 15 mCi, cerca de 3 a cerca de 15 mCi, cerca de 5 a cerca de 15 mCi, cerca de 1 a cerca de 10 mCi ou cerca de 3 a cerca de 10 mCi.

[00143] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo liga LAG3 monomérico humano com uma constante de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) de menos do que cerca de 2 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37° C.

[00144] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo liga LAG3 monomérico humano com uma  $K_D$  menor do que cerca de 1,5 nM em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C.

[00145] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo liga LAG3 humano dimérico com uma  $K_D$  de menos do que cerca de 90 pM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37° C.

[00146] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga LAG3 humano dimérico com uma  $K_D$  menor do que cerca de 20 pM em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25° C.

[00147] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compete pela ligação ao LAG3 humano com um anticorpo de referência compreendendo as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma HCVR, em que a HCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de HCVR listadas na Tabela 1; e as CDRs de uma LCVR, em que a LCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de LCVR listadas na Tabela 1. Em algumas modalidades, o



anticorpo de referência ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um par de sequência de aminoácido HCVR/LCVR como apresentado na Tabela 1. Em algumas modalidades, o anticorpo de referência compreende um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 e 554/562.

[00148] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo intensifica o LAG3 ligando ao MHC classe II. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo bloqueia o LAG3 ligando ao MHC classe II. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo não aumenta ou diminui a ligação de LAG3 aos seus ligandos.

[00149] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma HCVR, em que a HCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 e 554; e as CDRs de uma LCVR, em que a LCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 e 562. Em algumas modalidades, o anticorpo isolado compreende um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58,

66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 e 554/562. Em algumas modalidades, o anticorpo isolado compreende um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 386/394, 418/426, 538/546, 577/578, 579/578 e 580/581.

[00150] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente ao LAG3 humano, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada (HCVR) tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de HCVR listadas na Tabela 1.

[00151] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente ao LAG3 humano, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve (LCVR) tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de LCVR listadas na Tabela 1.

[00152] Em algumas modalidades, o anticorpo, um anticorpo monoclonal humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente ao LAG3 humano, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende (a) uma HCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de HCVR listadas na Tabela 1; e (b) uma LCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de LCVR listadas na Tabela 1.

[00153] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação

ao antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas dentro e qualquer uma das sequências de região variável de cadeia pesada (HCVR) listadas na Tabela 1; e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas dentro de qualquer uma das sequências de região variável de cadeia leve (LCVR) listadas na Tabela 1.

[00154] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende:

(a) um domínio de HCDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 e 556;

(b) um domínio de HCDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 e 558;

(c) um domínio de HCDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 e 560;

(d) um domínio LCDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 e 564;

(e) um domínio de LCDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 14, 30, 46,

62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 e 566; e

(f) um domínio LCDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 e 568.

[00155] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 e 554/562. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR selecionadas do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 386/394, 418/426 e 538/546.

### **E. Fabricação Escalonada para a Produção de Conjugados Quelantes do Anticorpo Anti-LAG3**

[00156] Estão incluídos na presente descrição os processos de fabricação escalonados para produzir anticorpos anti-LAG3 conjugados a um quelante. Os conjugados de anticorpo anti-LAG3-quelante estão em uma forma adequada para a radiorrotulação.

[00157] Bons processos de fabricação são aderidos e métodos os aspectos de produção, incluindo manter um ambiente estéril, praticar procedimentos assépticos, mantendo registros de todos os processos e documentar a qualidade, pureza, resistência e identidade do produto e quaisquer desvios destes.

[00158] O processo de fabricação escalonado é, em algumas

modalidades, mais rápido do que o processo de fabricação para a pesquisa e desenvolvimento. Em algumas modalidades, o processo de fabricação escalonado pode levar menos do que 12 horas ou menos do que 10 horas ou menos do que 8 horas ou menos do que 6 horas ou menos do que 4 horas ou menos do que ou cerca de 2 horas.

[00159] Em algumas modalidades, uma primeira etapa compreende ultrafiltração e diafiltração (UFDF), usando uma membrana de 30 a 50 kDa, do anticorpo anti-LAG3 para remover os excipientes, espécies que interferem com a conjugação e sais que inibem o processo de conjugação. Os polímeros de membrana exemplares incluem polietersulfona (PES), acetato de celulose (CA) e celulose regenerada (RC). Nesta etapa, o anticorpo é um tampão trocado em uma solução de tampão de baixa concentração iônica e que não interfere. O pH do tampão pode ser entre cerca de 4,5 a cerca de 6 ou cerca de 5 a cerca de 6 ou cerca de 5,3 a cerca de 5,7 ou cerca de 5,5. Os sistemas de tampão aqui considerados incluem qualquer sistema de tampão sem uma amina primária. Os tampões exemplares incluem tampões de acetato, fosfato ou citrato. O tampão provê uma estabilidade de proteína durante o processamento de pré-conjugação. O volume do processo pode ser novamente reduzido para concentrar o anticorpo, depois de filtrado estéril.

[00160] Após o UFDF de pré-conjugação, o anticorpo concentrado e filtrado pode ser transferido em um sistema de tampão de carbonato isento de amina. O sistema de tampão de carbonato pode ter um pH em uma faixa de cerca de 8,5 a cerca de 9,6 ou de cerca de 9,0 a cerca de 9,6 ou de cerca de 9,2 a cerca de 9,4 ou de cerca de 9,4 a cerca de 9,6 ou um pH de cerca de 9,4.

[00161] Um quelante, por exemplo, DFO, em solvente é adicionado a uma concentração alvo no sistema de tampão contendo o anticorpo e solvente adicional pode ser adicionado à solução até uma porcentagem desejada. O quelante pode ser adicionado em um excesso molar do anticorpo, por exemplo, 3,5 as 5:1 de quelante para anticorpo. O volume de reação total pode

ser de até 5 l.

[00162] A temperatura de reação e o tempo de reação são inversamente relacionados. Por exemplo, se a temperatura de reação é mais alta, o tempo de reação é mais baixo. Se a temperatura de reação é mais baixa, o tempo de reação é mais baixo. Ilustrativamente, em uma temperatura acima de cerca de 18° C, a reação pode levar menos do que 2 horas; em uma temperatura abaixo de 18° C, a reação pode levar mais do que 2 horas.

[00163] A reação de conjugação pode ser terminada por extinção, por exemplo, através da adição de ácido acético.

[00164] Em algumas modalidades, a conjugação do anticorpo com desferroxamina é realizada para produzir conjugados de DFO-mAb. Em algumas modalidades, a conjugação do anticorpo com p-SCN-Bn-desferroxamina é realizada para produzir conjugados de DFO-mAb.

[00165] Os solventes exemplares para o quelador incluem DMSO e DMA. As etapas de UFDF subsequentes utilizam membranas e a membrana é escolhida com base no sistema solvente usado na etapa de conjugação. Por exemplo, o DMA dissolve as membranas de PES, de modo que os dois não podem ser usados no mesmo sistema.

[00166] Os tampões de carbonato não são preferidos quanto a estabilidade do conjugado durante o armazenamento de longo prazo. Deste modo, uma vez que os conjugados de anticorpo-quelador foram formados, estes podem ser trocados de tampão em um tampão escolhido especificamente para o armazenamento e estabilidade de longo termo. Os tampões exemplares incluem tampões de citrato, acetato, fosfato, arginina e histidina. Uma etapa de UFDF adicional pode ser realizada para remover os sais residuais e para prover uma concentração, nível de excipiente e pH adequados dos anticorpos monoclonais conjugados. Os conjugados de anticorpo-quelante resultantes podem ser filtrados esterilmente e armazenados para a formulação subsequente.

### III. Métodos de Usar Imunoconjugados Radiorrotulados

[00167] Em certos aspectos, a presente descrição provê métodos de diagnóstico e terapêuticos de uso dos conjugados de anticorpo radiorrotulados da presente descrição.

[00168] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos de detectar LAG3 em um tecido, os métodos compreendendo administrar um conjugado de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado do aqui provido ao tecido; e visualizar a expressão de LAG3 pelo imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET). Em certas modalidades, o tecido compreende células ou linhagens de célula. Em certas modalidades, o tecido está presente em um sujeito, em que o sujeito é um mamífero. Em certas modalidades, o sujeito é um sujeito humano. Em certas modalidades, o sujeito tem uma doença ou distúrbio selecionados do grupo consistindo em câncer, doença infecciosa e doença inflamatória. Em uma modalidade, o sujeito tem câncer. Em certas modalidades, a doença infecciosa é uma infecção bacteriana, por exemplo, causada por bactérias riquetsiais, bacilos, klebsiella, meningococos e gonococos, proteus, pneumococos, pseudomonas, estreptococos, estafilococos, *Serratia*, *Borriella*, bacilo antracis, Clamídia, Clostrídio, *Corynebacterium diphtheriae*, Legionela, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, Salmonela, *Vibrio cholerae* e *Yersinia pestis*. Em certas modalidades, a doença infecciosa é uma infecção viral, por exemplo, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), vírus do herpes (por exemplo, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, CMV e vírus de Epstein Barr), vírus do papiloma humano (HPV), vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) e vírus da imunodeficiência símia (SIV). Em certas modalidades, a doença infecciosa é uma infecção parasítica, por exemplo, causada por *Entamoeba spp.*, *Enterobius vermicularis*, *Leishmania spp.*, *Toxocara spp.*, *Plasmodium spp.*, *Schistosoma spp.*, *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

Em certas modalidades, a doença infecciosa é uma infecção fúngica, por exemplo, causada por *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*, etc.), *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*.

[00169] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos de imagear um tecido que expressa LAG3 compreendendo administrar um conjugado de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado da presente descrição ao tecido; e visualizar a expressão de LAG3 pelo imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET). Em uma modalidade, o tecido está compreendido em um tumor. Em uma modalidade, o tecido está compreendido em uma cultura de célula de tumor ou linhagem de célula de tumor. Em uma modalidade, o tecido é compreendido em uma lesão tumoral em um sujeito. Em uma modalidade, o tecido é linfócitos intratumorais em um tecido. Em uma modalidade, o tecido compreende células que expressam LAG3.

[00170] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para medir resposta a uma terapia, em que a resposta a uma terapia é medida medindo-se a inflamação. Os métodos, de acordo com este aspecto, compreendem administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado provido aqui a um sujeito em necessidade do mesmo e visualizar a expressão de LAG3 pelo imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET). Em certas modalidades, a inflamação está presente em um tumor no sujeito. Em certas modalidades, um aumento na expressão de LAG3 correlaciona-se com o aumento na inflamação em um tumor. Em certas modalidades, a inflamação está presente em um tecido infectado no sujeito. Em certas modalidades, uma diminuição na expressão de LAG3 correlaciona-se com uma diminuição na inflamação em um tecido infectado.



[00171] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para medir resposta a uma terapia, em que a resposta a uma terapia é medida medindo-se a inflamação. Os métodos, de acordo com este aspecto, compreendem (i) administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado aqui provido a um sujeito em necessidade do mesmo e visualizar a expressão de LAG3 pelo imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET) e (ii) repetir a etapa (i) uma ou mais vezes depois do início da terapia. Em certas modalidades, a inflamação está presente em um tecido no sujeito. Em certas modalidades, um aumento na expressão de LAG3 correlaciona-se com o aumento na inflamação no tecido. Em certas modalidades, uma diminuição na expressão de LAG3 correlaciona-se com uma diminuição na inflamação no tecido. Em certas modalidades, expressão de LAG3 visualizada na etapa (i) é comparada com a expressão de LAG3 visualizada na etapa (ii).

[00172] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para determinar se um paciente é adequado para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido, administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado da presente descrição e localizar o conjugado de anticorpo radiorrotulado administrado no tumor pelo imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor identifica o paciente como adequado para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3.

[00173] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para identificar um candidato para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3 e um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido, administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado da presente descrição e localizar o conjugado de anticorpo radiorrotulado administrado no tumor pelo imageamento de PET em que a presença do

conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor identifica o paciente como adequado para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3. Em algumas modalidades, o paciente é administrado adicionalmente com um conjugado anti-PD-1 radiorrotulado e o conjugado anti-PD-1 radiorrotulado administrado é localizado no tumor pelo imageamento de PET, em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor identifica o paciente como adequado para a terapia antitumoral compreendendo um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1.

[00174] Também são aqui providos métodos para prognosticar a resposta de um paciente a uma terapia antitumoral, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido; e determinar se o tumor é LAG3-positivo, em que se o tumor é LAG3-positivo o mesmo prognostica uma resposta positiva do paciente a uma terapia antitumoral. Em certas modalidades, o tumor é determinado positivo pela administração de um conjugado de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado da presente descrição e localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é LAG3-positivo.

[00175] Em algumas modalidades, a terapia antitumoral é selecionada de um inibidor de PD-1 (por exemplo, REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab e pembrolizumab), um inibidor de PD-L1 (por exemplo, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105 e REGN3504, assim como aqueles divulgados na Publicação de Patente No. US 2015-0203580), inibidor de CTLA-4 (por exemplo, ipilimumab), um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T (por exemplo, um anticorpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 ou VISTA), um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [por exemplo, um “VEGF-Trap”

tal como aflibercept ou outra proteína de fusão inibidora de VEGF como apresentada na US 7.087.411, ou um anticorpo anti-VEGF ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo (por exemplo, bevacizumab, ou ranibizumab) ou um inibidor da cinase de molécula pequena do receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib, ou pazopanib)], um inibidor de Ang2 (por exemplo, nesvacumab), um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, erlotinib, cetuximab), um inibidor de CD20 (por exemplo, um anticorpo anti-CD20 tal como rituximab), um anticorpo para um antígeno específico de tumor [por exemplo, CA9, CA125, antígeno 3 associado a melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionário (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico da próstata (PSA), mucina-1, MART-1 e CA19-9], uma vacina (por exemplo, bacilo Calmette-Guerin, uma vacina contra o câncer), um adjuvante para aumentar a apresentação a antígeno (por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago), um anticorpo biespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico CD3xCD20, ou anticorpo biespecífico PSMAxCD3), uma citotoxina, um agente quimioterapêutico (por exemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel e vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R (por exemplo, sarilumab), um inibidor de IL-4R (por exemplo, dupilumab), um inibidor de IL-10, uma citocina uma citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15 e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) (por exemplo, ADC anti-CD19-DM4 e ADC anti-DS6-DM4).

[00176] Em algumas modalidades, a terapia antitumoral é selecionada das seguintes: nivolumab, ipilimumab, pembrolizumab e combinações das mesmas.

[00177] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê

métodos para prognosticar resposta de um paciente a um terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido, determinar se o tumor é LAG3-positivo, em que uma resposta positiva do paciente é prognosticada se o tumor é LAG3-positivo. Em certas modalidades, o tumor é determinado positivo pela administração de um conjugado de anticorpo radiorrotulado da presente descrição e localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é LAG3-positivo.

[00178] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para prognosticar resposta de um paciente a um terapia antitumoral compreendendo um inibidor de LAG3 em combinação com um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1, os métodos compreendendo selecionar um paciente com um tumor sólido, determinar se o tumor é LAG3 positivo e PD-1-positivo, em que uma resposta positiva do paciente é prognosticada se o tumor é LAG3 positivo e PD-1-positivo. Em certas modalidades, o tumor é determinado LAG3 positivo pela administração de um conjugado anti-LAG3 radiorrotulado e localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é LAG3-positivo. Em certas modalidades, o tumor é determinado PD-1 positivo administrando-se adicionalmente um conjugado anti-PD-1 radiorrotulado e localizando-se o conjugado anti-PD-1 radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é PD-1-positivo.

[00179] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para detectar um tumor LAG3-positivo em um sujeito. Os métodos, de acordo com este aspecto, compreendem selecionar um sujeito com um tumor sólido; administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado da

presente descrição ao sujeito; e determinar a localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado pelo imageamento de PET, em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado em um tumor indica que o tumor é LAG3-positivo.

[00180] Em alguns aspectos, o sujeito em necessidade do mesmo é administrado com uma dose de cerca de 20 mg ou menos, uma dose de cerca de 15 mg ou menos, uma dose de cerca de 10 mg ou menos, por exemplo, uma dose de 2 mg, ou 5 mg, ou 10 mg, de um conjugado de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado.

[00181] Como aqui usada, a expressão “um sujeito em necessidade do mesmo” significa um mamífero humano ou não humano que exibe um ou mais sintomas ou indicações de câncer, e/ou que foi diagnosticado com câncer, incluindo um tumor sólido e que necessita de tratamento para o mesmo. Em muitas modalidades, o termo “sujeito” pode ser intercambiavelmente usado com o termo “paciente”. Por exemplo, um sujeito humano pode ser diagnosticado com um tumor primário ou um metastático e/ou com um ou mais sintomas ou indicações incluindo, mas não limitado a, perda de peso inexplicada, fraqueza geral, fadiga persistente, perda de apetite, febre, suores noturnos, dor óssea, dificuldade em respirar, abdômen inchado, dor/pressão no peito, aumento do baço e elevação no nível de um biomarcador relacionado com o câncer (por exemplo, CA125). A expressão inclui sujeitos com tumores primários ou estabelecidos. Em modalidades específicas, a expressão inclui sujeitos humanos que têm e/ou necessitam de tratamento para um tumor sólido, por exemplo, câncer colônico, câncer mamário, câncer pulmonar, câncer prostático, câncer de pele, câncer hepático, câncer ósseo, câncer ovariano, câncer cervical, câncer pancreático, câncer da cabeça e pescoço e câncer cerebral. O termo inclui sujeitos com tumores primários ou metastáticos (malignidades avançadas). Em certas modalidades, a expressão “um sujeito em necessidade do mesmo” inclui pacientes com um

tumor sólido que é resistente a ou refratário a ou é inadequadamente controlado pela terapia anterior (por exemplo, tratamento com um agente anticâncer). Por exemplo, a expressão inclui sujeitos que foram tratados com uma ou mais linhas da terapia anterior tais como tratamento com quimioterapia (por exemplo, carboplatina ou docetaxel). Em certas modalidades, a expressão “um sujeito em necessidade do mesmo” inclui pacientes com um tumor sólido que foi tratado com uma ou mais linhas da terapia anterior, mas que subsequentemente recaiu ou metastatizou. Em certas modalidades, o termo inclui sujeitos tendo uma doença ou distúrbio inflamatórios incluindo, mas não limitados a, câncer, artrite reumatoide, aterosclerose, periodontite, febre do feno, doença cardíaca, doença da artéria coronária, doença infecciosa, bronquite, dermatite, meningite, asma, tuberculose, colite ulcerativa, doença de Crohn, doença intestinal inflamatória, hepatite, sinusite, psoríase, alergia, fibrose, lúpus, vasculite, espondilite anquilosante, doença de Graves, doença celíaca, fibromialgia e rejeição a transplante.

[00182] Em certas modalidades, os métodos da presente descrição são usados em um sujeito com um tumor sólido. Os termos “tumor”, “câncer” e “malignidade” são aqui intercambiavelmente usados. Como aqui usado, o termo “tumor sólido” refere-se a uma massa anormal de tecido que usualmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos (não câncer) ou malignos (câncer). Em algumas modalidades, o tumor é metastático. Para os propósitos da presente descrição, o termo “tumor sólido” significa tumores sólidos malignos. O termo inclui tipos diferentes de tumores sólidos denominados quanto aos tipos de célula que os formam, *viz.* sarcomas, carcinomas e linfomas. Em certas modalidades, o termo “tumor sólido” inclui cânceres incluindo, mas não limitados a, câncer colorretal, câncer ovariano, câncer prostático, câncer mamário, câncer cerebral, câncer cervical, câncer vesical, câncer anal, câncer uterino, câncer colônico, câncer

hepático, melanoma, melanoma metastático, câncer pancreático, câncer pulmonar, câncer endometrial, câncer ósseo, câncer testicular, câncer de pele, câncer renal, câncer estomacal, câncer esofágico, câncer da cabeça e pescoço, câncer da glândula salivar e mieloma.

[00183] Em algumas modalidades, os métodos aqui divulgados podem ser usados em um sujeito com câncer, por exemplo, um sujeito tendo câncer hematológico, câncer cerebral, câncer de célula renal, câncer ovariano, câncer vesical, câncer prostático, câncer mamário, carcinoma de célula hepática, câncer ósseo, câncer colônico, câncer pulmonar de célula não pequena, carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço, câncer colorretal, mesotelioma, linfoma de célula B e melanoma. Em alguns aspectos, o câncer é metastático, por exemplo, melanoma metastático.

[00184] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos de tratar um tumor em um sujeito. Os métodos, de acordo com este aspecto, compreendem selecionar um sujeito com um tumor sólido; determinar que o tumor é LAG3-positivo; e administrar uma ou mais doses de um inibidor de LAG3. Em certas modalidades, o tumor é determinado ser LAG3-positivo pela administração de um conjugado de anticorpo radiorrotulado da presente descrição ao sujeito; e visualização do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET, em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é LAG3-positivo.

[00185] Em um aspecto adicional, os métodos de tratamento compreendem administrar uma ou mais doses de um inibidor de LAG3 em combinação com um inibidor de CTLA-4 (por exemplo, ipilimumab), um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T (por exemplo, um anticorpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 ou VISTA), um inibidor da indoleamina-2,3-

dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [por exemplo, um “VEGF-Trap” tal como aflibercept ou outra proteína de fusão inibidora de VEGF como apresentada na US 7.087.411, ou um anticorpo anti-VEGF ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo (por exemplo, bevacizumab, ou ranibizumab) ou um inibidor da cinase de molécula pequena do receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib, ou pazopanib)], um inibidor de Ang2 (por exemplo, nesvacumab), um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, erlotinib, cetuximab), um inibidor de CD20 (por exemplo, um anticorpo anti-CD20 tal como rituximab), um anticorpo para um antígeno específico de tumor [por exemplo, CA9, CA125, antígeno 3 associado a melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionário (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico da próstata (PSA), mucin-1, MART-1 e CA19-9], uma vacina (por exemplo, bacilo Calmette-Guerin, uma vacina contra o câncer), um adjuvante para aumentar a apresentação a antígeno (por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago), um anticorpo biespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico CD3xCD20, ou anticorpo biespecífico PSMAxCD3), uma citotoxina, um agente quimioterapêutico (por exemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel e vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R (por exemplo, sarilumab), um inibidor de IL-4R (por exemplo, dupilumab), um inibidor de IL-10, uma citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15, um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) (por exemplo, ADC anti-CD19-DM4 e ADC anti-DS6-DM4), um fármaco anti-inflamatório (por exemplo, corticosteroides e fármacos anti-inflamatórios não esteroidais), um suplemento dietético tal como antioxidantes ou qualquer outro cuidado de terapia para tratar câncer. Em certas modalidades, um



inibidor de LAG3 pode ser usado em combinação com vacinas contra o câncer incluindo vacinas de célula dendrítica, vírus oncolíticos, vacinas de célula de tumor, etc. para aumentar a resposta antitumoral. Os exemplos de vacinas contra o câncer que podem ser usadas em combinação com um inibidor de LAG3 incluem vacina MAGE3 para melanoma e câncer vesical, vacina MUC1 para câncer mamário, EGFRv3 (por exemplo, Rindopepimut) para câncer cerebral (incluindo glioblastoma multiforme), ou ALVAC-CEA (para cânceres CEA+).

[00186] Em certas modalidades, um inibidor de LAG3 pode ser usado em combinação com radiação terapia em métodos para gerar respostas antitumorais duráveis de longa duração e/ou realçar a sobrevivência dos pacientes com câncer. Em algumas modalidades, o inibidor de LAG3, por exemplo um anticorpo anti-LAG3, pode ser administrado antes, concomitantemente ou depois de administrar terapia de radiação a um paciente com câncer. Por exemplo, a terapia de radiação pode ser administrada em uma ou mais doses às lesões de tumor seguida pela administração de uma ou mais doses de anticorpos anti-LAG3. Em algumas modalidades, a terapia de radiação pode ser administrada localmente a uma lesão tumoral para realçar a imunogenicidade local de um tumor do paciente (radiação adjuvante) e/ou para matar as células de tumor (radiação ablativa) seguida pela administração sistêmica de um anticorpo anti-LAG3. Por exemplo, a radiação intracraniana pode ser administrada a um paciente com câncer cerebral (por exemplo, glioblastoma multiforme) em combinação com a administração sistêmica de um anticorpo anti-LAG3. Em certas modalidades, os anticorpos anti-LAG3 podem ser administrados em combinação com terapia de radiação e um agente quimioterapêutico (por exemplo, temozolomida) ou um antagonista de VEGF (por exemplo, aflibercept).

[00187] Em certas modalidades, um inibidor de LAG3 pode ser

administrado em combinação com um ou mais fármacos antivirais para tratar infecção viral, por exemplo, causada por LCMV, HIV, HPV, HBV ou HCV. Os exemplos de fármacos antivirais incluem, mas não são limitados a, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina e corticosteroides.

[00188] Em certas modalidades, um inibidor de LAG3 pode ser administrado em combinação com um ou mais fármacos antibacterianos para tratar infecção bacteriana, por exemplo, causada por bactérias riquetsiais, bacilos, *klebsiella*, meningococos e gonococos, proteus, pneumonococos, pseudomonas, estreptococos, estafilococos, *serratia*, *Borriella*, bacilo antracítico, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia pestis*. Os exemplos de antibacterianos incluem, mas não são limitados a, penicilinas, tetraciclina, cefalosporinas, quinolonas, lincomicina, macrolídeos, cetolídeos, sulfonamidas, glicopeptídeos, aminoglicosídeos e carbapenemas.

[00189] Em certas modalidades, um inibidor de LAG3 pode ser administrado em combinação com um ou mais fármacos antifúngicos para tratar infecção fúngica, por exemplo, causada por *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*, etc.), *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenkii*. Os exemplos de fármacos antifúngicos incluem, mas não são limitados a, anfotericina B, fluconazol, voriconazol, posaconazol, itraconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina, micafungina e flucitosina.

[00190] Em certas modalidades, um inibidor de LAG3 pode ser administrado em combinação com um ou mais fármacos antiparasíticos para tratar infecção parasítica, por exemplo, causada por *Entamoeba* spp.,

*Enterobius vermicularis*, *Leishmania* spp., *Toxocara* spp., *Plasmodium* spp., *Schistosoma* spp., *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. Os exemplos de fármacos antiparasíticos incluem, mas não são limitados a, praziquantel, oxamniquina, metronidazol, tinidazol, nitazoxanida, desidroemetina ou cloroquina, furoato de diloxanida, iodoquinolina, cloroquina, paromomicina, pamoato de pirantel, albendazol, nifurtimox e benznidazol.

[00191] O agente(s)/componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional(is) pode(m) ser administrado(s) antes, concorrente com, ou depois da administração do inibidor de LAG3. Para os propósitos da presente descrição, tais regimes de administração são considerados a administração de um inibidor de LAG3 “em combinação com” um segundo componente terapeuticamente ativo.

[00192] Em alguns aspectos, os métodos de tratamento compreendem selecionar um sujeito com uma infecção bacteriana, uma infecção viral, uma infecção fúngica, ou uma infecção parasítica; determinar que um tecido afetado no sujeito é LAG3-positivo; e administrar uma ou mais doses de um agente terapêutico apropriado para a infecção. Em certas modalidades, o tecido afetado é determinado ser LAG3-positivo pela administração de um conjugado anti-LAG3 radiorrotulado da presente descrição ao sujeito; e visualizar o conjugado de anticorpo radiorrotulado no sujeito pelo imageamento de PET, em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado em um tecido indica que o tecido é LAG3-positivo. Em certas modalidades, as etapas de administrar e visualizar são realizadas uma ou mais vezes de modo a monitorar a eficácia do agente terapêutico no tratamento da infecção.

[00193] Em alguns aspectos, os métodos de tratamento compreendem selecionar um sujeito com um tumor sólido; determinar que o tumor é LAG3-positivo e PD-1-positivo; e administrar uma ou mais doses de um inibidor de

LAG3 e/ou uma ou mais doses de um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1). Em certas modalidades, o tumor é determinado ser LAG3-positivo pela administração de um conjugado anti-LAG3 radiorrotulado da presente descrição ao sujeito; e visualizar o conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET, em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor é LAG3-positivo. Em certas modalidades, o tumor é determinado ser PD-1-positivo pela administração de um conjugado anti-PD-1 radiorrotulado da presente descrição ao sujeito; e visualizar o conjugado anti-PD-1 radiorrotulado no tumor pelo imageamento de PET, em que a presença do conjugado anti-PD-1 radiorrotulado no tumor indica que o tumor é PD-1-positivo.

[00194] Os anticorpos anti-PD-1 exemplares incluem REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab e pembrolizumab.

[00195] Os anticorpos anti-PD-L1 exemplares incluem atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105 e REGN3504, assim como aqueles divulgados na Publicação de Patente No. US 2015-0203580.

[00196] O inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1 pode ser administrado antes da, concorrente com, ou depois da administração do inibidor de LAG3. Para os propósitos da presente descrição, tais regimes de administração são considerados a administração de um inibidor de LAG3 “em combinação com” um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1.

[00197] Como aqui usados, os termos “tratar”, “tratamento”, ou os semelhantes, significam aliviar sintomas, eliminar a causa de sintomas em uma base temporária ou permanente, para retardar ou inibir o crescimento de tumor, para reduzir a carga de célula tumoral ou carga tumoral, para promover a regressão de tumor, para causar o encolhimento de tumor, necrose e/ou desaparecimento, para prevenir a reocorrência de tumor, para prevenir ou inibir a metástase, para inibir crescimento de tumor metastático, e/ou para

aumentar a duração da sobrevivência do sujeito.

[00198] De acordo com um aspecto, a presente descrição provê métodos para monitorar a eficácia de uma terapia antitumoral em um sujeito, em que os métodos compreendem selecionar um sujeito com um tumor sólido em que o sujeito está sendo tratado com uma terapia antitumoral; administrar um conjugado anti-LAG3 radiorrotulado da presente descrição ao sujeito; imagear a localização do conjugado radiorrotulado administrado no tumor pelo imageamento de PET; e determinar o crescimento de tumor, em que uma diminuição da linha de base no sinal radiorrotulado indica eficácia da terapia antitumoral. Em certas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3. Em certas modalidades, a terapia antitumoral compreende adicionalmente um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1).

[00199] Em certas modalidades, a presente descrição provê métodos para avaliar mudanças no estado inflamatório de um tumor, os métodos compreendendo selecionar um sujeito com um tumor sólido em que o sujeito está sendo tratado com uma terapia antitumoral; administrar um conjugado anti-LAG3 radiorrotulado aqui provido ao sujeito; e imagear a localização do conjugado radiorrotulado administrado no tumor pelo imageamento de PET, em que um aumento da linha de base no sinal radiorrotulado indica aumento na inflamação e eficácia da terapia antitumoral. Em certas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3 e/ou um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1). Em certas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de PD-1 (por exemplo, REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab e pembrolizumab), um inibidor de PD-L1 (por exemplo, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105 e REGN3504), inibidor de CTLA-4 (por exemplo, ipilimumab), um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor

de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T (por exemplo, um anticorpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 ou VISTA), um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [por exemplo, um “VEGF-Trap” tal como aflibercept ou outra proteína de fusão inibidora de VEGF como apresentada na US 7.087.411, ou um anticorpo anti-VEGF ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo (por exemplo, bevacizumab, ou ranibizumab) ou um inibidor da cinase de molécula pequena do receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib, ou pazopanib)], um inibidor de Ang2 (por exemplo, nesvacumab), um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, erlotinib, cetuximab), um inibidor de CD20 (por exemplo, um anticorpo anti-CD20 tal como rituximab), um anticorpo para um antígeno específico de tumor [por exemplo, CA9, CA125, antígeno 3 associado a melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionário (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico da próstata (PSA), mucina-1, MART-1 e CA19-9], uma vacina (por exemplo, bacilo Calmette-Guerin, uma vacina contra o câncer), um adjuvante para aumentar a apresentação antigênica (por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago), um anticorpo biespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico CD3xCD20, ou anticorpo biespecífico PSMAxCD3), uma citotoxina, um agente quimioterapêutico (por exemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel e vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R (por exemplo, sarilumab), um inibidor de IL-4R (por exemplo, dupilumab), um inibidor de IL-10, uma citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15 e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) (por exemplo, ADC anti-CD19-DM4 e ADC anti-DS6-DM4).

[00200] Como aqui usado, o termo “linha de base,” com respeito à expressão de LAG3 no tumor, significa o valor numérico de captação do conjugado radiorrotulado para um sujeito antes ou no momento de administração de uma dose de terapia antitumoral. A captação do conjugado radiorrotulado é determinada usando métodos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Oosting *et al* 2015, J. Nucl. Med. 56: 63-69). Em certas modalidades, a terapia antitumoral compreende um inibidor de LAG3.

[00201] Em algumas modalidades, a varredura sequencial de iPET e biópsias de tumor são realizadas antes e depois do tratamento com padrão de imunoterapias de cuidado. Tais imunoterapias podem ser selecionadas das seguintes: nivolumab, ipilimumab, pembrolizumab e combinações dos mesmos.

[00202] Para determinar se existe eficácia na terapia antitumoral, a captação do conjugado radiorrotulado é quantificada na linha de base e em um ou mais pontos de tempo depois da administração do inibidor de LAG3. Por exemplo, a captação do conjugado de anticorpo radiorrotulado administrado (por exemplo, conjugado de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado) pode ser medida no dia 2, dia 3, dia 4, dia 5, dia 6, dia 7, dia 8, dia 9, dia 10, dia 11, dia 12, dia 14, dia 15, dia 22, dia 25, dia 29, dia 36, dia 43, dia 50, dia 57, dia 64, dia 71, dia 85; ou no final da semana 1, semana 2, semana 3, semana 4, semana 5, semana 6, semana 7, semana 8, semana 9, semana 10, semana 11, semana 12, semana 13, semana 14, semana 15, semana 16, semana 17, semana 18, semana 19, semana 20, semana 21, semana 22, semana 23, semana 24, ou mais longo, depois do tratamento inicial com o inibidor de LAG3 (por exemplo, um anticorpo anti-LAG3). A diferença entre o valor da captação em um ponto de tempo particular a seguir do início do tratamento e o valor da captação na linha de base é usado para estabelecer se a terapia antitumoral é eficaz (regressão ou progressão de tumor).

[00203] Em certas modalidades, o conjugado de anticorpo

radiorrotulado é administrado intravenosa ou subcutaneamente ao sujeito. Em certas modalidades, o conjugado de anticorpo radiorrotulado é administrado intratumoralmente. Na administração, o conjugado de anticorpo radiorrotulado está localizado no tumor. O conjugado de anticorpo radiorrotulado localizado é imageado pelo imageamento de PET e a captação do conjugado de anticorpo radiorrotulado pelo tumor é medida pelos métodos conhecidos na técnica. Em certas modalidades, o imageamento é realizado 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias depois da administração do conjugado radiorrotulado. Em certas modalidades, o imageamento é realizado no mesmo dia na administração do conjugado de anticorpo radiorrotulado.

[00204] Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo se ligam especificamente a LAG3. Em certas modalidades, o anticorpo anti-LAG3 compreende as CDRs de um HCVR, em que o HCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 e 554; e as CDRs de um LCVR, em que o LCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 e 562.

[00205] Em certas modalidades, o inibidor de LAG3 compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a LAG3. Em certas modalidades, o anticorpo anti-LAG3 é BMS986016. Em certas outras modalidades, o inibidor de LAG3 compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se ligam especificamente a LAG3. Em uma modalidade, o anticorpo anti-LAG3 compreende um HCVR da SEQ ID NO: 418 e um LCVR da SEQ ID NO: 426.



#### IV. Exemplos

[00206] Certas modalidades da descrição são ilustradas pelos seguintes exemplos não limitantes.

##### **Exemplo 1: Geração de Anticorpos Humanos para LAG3**

[00207] Anticorpos humanos para LAG3 foram gerados usando um fragmento de LAG3 que varia de cerca de 29 a 450 aminoácidos do GenBank Acesso NP\_002277.4 (SEQ ID NO: 582) geneticamente fundidos a uma região Fc de camundongo. O imunógeno foi administrado diretamente, com um adjuvante para estimular a resposta imune, a um camundongo VELOCIMMUNE® (isto é, um camundongo engenheirado compreendendo DNA que codifica as regiões variáveis de cadeia pesada e leve capa da imunoglobulina humana), como descrito na US 8.502.018 B2, ou a um camundongo VelocImmune® de Cadeia Leve Universal (ULC) humanizado, como descrito na WO 2013022782. A resposta imune do anticorpo foi monitorada por um imunoensaio específico de LAG3. Quando uma resposta imune desejada foi obtida esplenócitos foram colhidos e fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar a sua viabilidade e formar linhagens de célula de hibridoma. As linhagens de célula de hibridoma foram triadas e selecionadas para identificar linhagens de célula que produzem anticorpos específicos de LAG3. Usando esta técnica e o imunógeno descrito acima, diversos anticorpos quiméricos anti-LAG3 (isto é, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongo) foram obtidos. Versões totalmente humanas dos anticorpos podem ser fabricadas substituindo-se a região constante de camundongo com uma região constante humana. Os anticorpos exemplares gerados desta maneira a partir do camundongo VELOCIMMUNE® foram designados como H1M14985N, H1M14987N, H2M14811N, H2M14885N, H2M14926N, H2M14927N, H2M14931N, H2M18336N, H2M18337N e H4H14813N.

[00208] Os anticorpos anti-LAG3 também foram isolados diretamente

de células B positivas em antígeno (de cada um dos camundongos imunizados) sem fusão às células de mieloma, como descrito na Patente U.S. 7.582.298, aqui especificamente incorporada por referência na sua totalidade. Usando este método, diversos anticorpos anti-LAG3 (isto é, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes humanos) foram obtidos; os anticorpos exemplares gerados desta maneira foram designados como segue: H4H15477P, H4H15483P, H4H15484P, H4H15491P, H4H17823P, H4H17826P2, H4H17828P2, H4sH15460P, H4sH15462P, H4sH15463P, H4sH15464P, H4sH15466P, H4sH15467P, H4sH15470P, H4sH15475P, H4sH15479P, H4sH15480P, H4sH15482P, H4sH15488P, H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2, H4sH15567P2, e H4H17819P.

[00209] Os anticorpos exemplares H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2, e H4sH15567P2 foram gerados a partir de células B a partir dos camundongos ULC VELOCIMMUNE®.

[00210] As propriedades biológicas dos anticorpos exemplares gerados de acordo com os métodos deste Exemplo são descritas em detalhes nos Exemplos apresentados abaixo.

## **Exemplo 2: Conjugação de anticorpo anti-LAG3 H4sH15482P com p-SCN-Bn-DFO**

[00211] De modo a modificar o anticorpo anti-LAG3 precursor, H4sH15482P (tendo um par de sequências HCVR/LCVR das SEQ ID NOs: 418/426; a seguir aludido como mAb1) e um anticorpo de controle de isótipo para ser adequado para os estudos ImmunoPET com radiorrotulação, um quelador, p-SCN-bn-Deferoxamina (DFO; Macrocylics, Cat #: B-705), foi fixado aos anticorpos.

[00212] Para a modificação, mAb1, foi primeiro trocado de tampão em

PBS, pH 7,2 a partir do tampão de histidina pela diálise a 4°C durante a noite (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 10k MWCO; ThermoScientific) depois trocado de tampão novamente usando uma coluna PD-10 (GE Healthcare, Cat. #: 17-0851-01) em um tampão composto de 50 mM de tampão de carbonato, 150 mM de NaCl, pH 9,0 (tampão de conjugação). Para determinar a concentração a seguir das trocas de tampão, as amostras foram medidas em um espectrômetro UV/VIS Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) usando o coeficiente de extinção com base na sequência MacVector de  $223400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e peso molecular  $145709 \text{ g/mol}$  (ver a Tabela 2). Em 15 tubos de polipropileno de um mL,  $1485,24 \mu\text{L}$  de mAb1 (70 mg) foram adicionados a  $5374,8 \mu\text{L}$  de tampão de conjugação. Uma solução de  $139 \mu\text{L}$  de DFO em DMSO foi adicionada em incrementos de um quarto à solução de mAb1, cada vez sendo suavemente misturados pela pipetagem para cima e para baixo. A solução final foi de 10 mg/mL de mAb1 em tampão de conjugação, 2% de DMSO com excesso de mol para mol de três vezes de DFO. Esta solução foi deixada incubar em um banho de água a 37°C sem nenhuma agitação adicional.

[00213] Depois de 30 minutos a 37°C, a solução foi imediatamente passada através de uma coluna de dessalinização PD-10 (GE Healthcare, Cat. #: 17-0851-01), pré-equilibrada com um tampão contendo 250 mM de NaAcO no pH 5,4 (tampão de formulação). O volume da solução foi reduzido em aproximadamente 50% com um concentrador MWCO de 10K (Unidade de Filtrações Centrífuga Amicon Ultra-15, EMD Millipore, Cat #: UFC901024). A solução final foi filtrada estéril via um filtro de seringa (filtro de seringa Acrodisc de 13 mm, Pall Corporation, Cat #: 4602). A concentração e a Razão de DFO-para-Anticorpo (DAR) foi subsequentemente medido pela espectroscopia UV/VIS. Ver a Figura 1. Para as medições de absorbância, o anticorpo conjugado a DFO foi medido contra o tampão de formulação a 252 nm ( $A_{252}$ ), 280 nm ( $A_{280}$ ) e 600 nm ( $A_{600}$ ). Para o

cálculo, o fundo foi corrigido em cada valor de absorbância usando a equação:

$$A'_{\lambda} = A_{\lambda} - A_{600}$$

[00214] O anticorpo conjugado foi testado quanto à agregação usando cromatografia de SEC, com 25 µg da amostra injetada em uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare, Cat. No. 17-5175-01) monitorada a 280 nm com uma fase móvel de PBS (0,75 mL/min). Ver a Figura 2. A integridade do anticorpo foi avaliada pela SDS-PAGE 4 a 20% de gel pré-moldado de Tris/Gly (Novex) com 2 µg da amostra carregada. A concentração de anticorpo, concentração de conjugado e DAR foram calculados usando as equações abaixo:

Cálculo da concentração de anticorpo

$$\text{Conc mAb (mg/mL)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}} * PM$$

Cálculo da concentração de conjugado

$$\text{Conc de (mg/mL)} = \frac{A'_{252} - 1.53A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1.53\epsilon_{280}} * PM$$

Cálculo de DAR

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

**Tabela 2: Coeficientes de extinção molar e peso molecular**

mAb	PM (gmol <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{280}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{252}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
mAb1	145709	223400	87077

**Tabela 3: UV DAR, porcentagem de agregado e concentração após fixação de DFO**

Anticorpo	UV DAR	Concentração (mg/mL)	% de agregado
mAb1	1,48	13,58	1,4%

**Exemplo 3: Quelação de <sup>89</sup>Zr de anticorpos monoclonais conjugados a DFO**

[00215] Para o uso nos estudos *in vivo* de ImmunoPET, o anticorpo anti-LAG3 conjugado a DFO, mAb1 e um anticorpo de controle de isótipo conjugado a DFO foram radiorrotulados com <sup>89</sup>Zr.

[00216] O anticorpo conjugado com DFO foi primeiro levado para 1,25 mg/mL em 1 M de HEPES, pH 7,2. A composição das soluções de conjugado DFO-Ab para cada estudo é listada na Tabela 4. Separadamente, solução  $^{89}\text{Zr}$  foi preparada usando as composições para cada estudo correspondente mostrado na Tabela 5. A solução de estoque de  $^{89}\text{Zr}$ -ácido oxálico foi obtida a partir do Imageamento 3D. A radioatividade final da solução foi primeiro confirmada usando um calibrador de dose Capintec CRC-25R (Capintec #520), depois imediatamente combinado com a solução de conjugado de DFO-Ab, suavemente misturada (pipetando para cima e para baixo) e subsequentemente incubada durante 45 minutos na temperatura ambiente.

[00217] Depois da incubação, as misturas foram transferidas para colunas de dessalinização, PD-10 (GE Healthcare, Cat. #: 17-0851-01) para o estudo 1 ou NAP-5 (GE Healthcare, Cat. # 17-0853-02) para o estudo 2, pré-equilibradas com 250 mM de acetato de sódio no pH 5,4 para a dessalinização alimentada por gravidade. Para o estudo 1, a mistura de reação foi adicionada a uma coluna PD-10. Depois que os conteúdos da reação entraram no leito da coluna, o fluxo direto foi descartado. O produto foi eluído com 250 mM de acetato de sódio no pH 5,4 (tampão de formulação) e o eluído foi coletado como pelas instruções do fabricante. Para o estudo 2, a mistura foi transferida para uma coluna NAP-5 e o fluxo direto foi descartado. O produto foi eluído com 250 mM de acetato de sódio no pH 5,4 (tampão de formulação) e eluato foi coletado pelas instruções do fabricante. A concentração de Ab foi subsequentemente medida pela espectroscopia UV/VIS, calculada usando o coeficiente de extinção apropriado e a absorção a 280 nm usando a equação:

[00218]  $\text{Concentração em mg/mL} = \text{Absorção a 280 nm} \div \text{Coeficiente de extinção a 280 nm (encontrado na Tabela 6)}$

[00219] A massa final medida em gramas foi registrada na Tabela 7. A radioatividade foi depois medida usando o calibrador de dose e relatada na

Tabela 7. O material final (5 µg) foi analisado usando um SEC-HPLC com UV 280 e detetor de radioisótopo conectado em série (Agilent 1260 com Detector Lablogic Radio-TLC/HPLC, SCAN-RAM) usando uma coluna de aumento Superdex 200 com fase móvel de PBS em uma taxa de fluxo de 0,75 mL/min. O radiotraçador foi usado para determinar a pureza radioquímica (100% - porcentagem de  $^{89}\text{Zr}$  não rotulado) comparando-se a integração do pico de proteína total (~10 a 16 min) e pico de  $^{89}\text{Zr}$  não rotulado (~ 25 min). A pureza monomérica percentual foi determinada pelo traçador UV 280 comparando-se a integração do pico das espécies de peso molecular alto (HMW) (10 min a ~ 15 min) para o monômero (~16 min).

[00220] A atividade específica e recuperação de proteína (%) de cada conjugado radiorrotulado foram determinadas usando as seguintes equações:

a. Massa de conjugado em mg = concentração em mg/mL x massa de solução em gramas

b. Atividade específica em mCi/mg = atividade de frasco em mCi ÷ massa de conjugado em mg

c. Recuperação de proteína = massa de conjugado de partida (mg) ÷ Massa de conjugado em mg

[00221] Finalmente a aparência foi observada e registrada na Tabela 7. Os resultados são consolidados na Tabela 7. Os cromatogramas radio-SEC-HPLC, mostrados nas Figuras 3 a 5, confirmam pelo menos 98% de pureza radioquímica. Os cromatogramas UV280-HPLC SEC mostrados nas Figuras 6 a 8 confirmam o produto altamente monoméricos (>90%).

#### **Tabela 4. Preparação de conjugado de DFO-anticorpo para a radiorrotulação**

Radiorrotulação#	Estudo #	Lotes de Radiorrotulação	Concentração (mg/mL)	DAR*	Massa de Conjugado (mg)	Volume total (µL)	Concentração Final (mg/mL)
1	1	Isótipo-DFO- $^{89}\text{Zr}$	15,4	1,53	250	200	1,25
2	1	mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	13,6	1,48	500	400	1,25
3	2	mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	13,6	1,48	100	80	1,25

\* DAR é definido como a Razão de DFO para Anticorpo

#### **Tabela 5. Preparação da solução de reação de $^{89}\text{Zr}$ para a**

**radiorrotulação**

Radiorrotulação	Estudo #	Lotes de Radiorrotulação	$^{89}\text{Zr}$ -oxalato ( $\mu\text{L}$ )	1 M de HEPES, pH ( $\mu\text{L}$ )	Vol Final ( $\mu\text{L}$ )	Atividade Final ( $\mu\text{Ci}$ )	Atividade específica ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ )
1	1	Isótipo-DFO- $^{89}\text{Zr}$	~3	500	1000	995	1,0
2	1	mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	~5	500	2000	2060	1,0
3	2	mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	~6	394	400	2010	5,0

**Tabela 6: Coeficientes de extinção para lotes conjugados**

Lote de Radiorrotulação	$\epsilon_{280}$ ( $\text{AU ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
Isótipo-DFO- $^{89}\text{Zr}$	1,70
mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	1,72

**Tabela 7. Sumário de conjugados de DFO-Ab rotulados com  $^{89}\text{Zr}$  para os estudos de imageamento e biodistribuição *in vivo***

Radiorrotulação	Estudo #	Lotes de Conjugado	Aparência	Pureza Radioquímica* (%)	Pureza Monomérica** (%)	Recuperação de proteína (%)	Conc. (mg/mL)	Atividade específica (mCi/ mg)
1	1	Isótipo-DFO- $^{89}\text{Zr}$	Clara	99,7%	98,6%	70%	0,108	3,41
2	1	mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	Clara	>99,9%	97,5%	70%	0,133	3,58
3	2	mAb1-DFO- $^{89}\text{Zr}$	Clara	98,2%	93,8 %	57%	0,121	14,7

\* pela rádio-SEC-HPLC, \*\* pela UV-SEC-HPLC

**Exemplo 4: Imunorreatividade**

[00222] A imunorreatividade (IR) do anticorpo anti-LAG3 e anticorpo de controle de isótipo radiorrotulados foi medida como segue. Nestes ensaios, 20 ng dos respectivos anticorpos rotulados com  $^{89}\text{Zr}$  foram adicionados a  $15 \times 10^6$  células MC38-cOVA/eGFP-mLAG3<sup>-/-</sup>hLAG3<sup>Tg</sup> em um volume final de 1 mL. As amostras foram incubadas durante 45 minutos (a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>) com mistura contínua antes de passar por 2 lavagens com meios para remover qualquer anticorpo não ligado. A radioatividade dos grânulos de célula de teste foi depois contada em um contador gama automático (2470 Wizard2, Perkin Elmer) contra 2 padrões de referência contendo os mesmos 20 ng de anticorpo rotulado com  $^{89}\text{Zr}$ . A imunorreatividade percentual foi determinada para as amostras usando a média dos padrões como uma medida da atividade total.

[00223] Como observado na Tabela 8, o anticorpo anti-LAG3 rotulado

com  $^{89}\text{Zr}$  reteve a imunorreatividade a seguir da conjugação e radiorrotulação, com 86% de IR.

**Tabela 8: Imunorreatividade de conjugados de DFO quelados com  $^{89}\text{Zr}$**

Amostras	Zr89 CPM
Padrão 1	39643
Padrão 2	40134
Média de Padrões	39889
Células	34261
IR	86%

**Exemplo 5: Localização seletiva de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado para tumores positivos em LAG3 em camundongos**

***Implantação de tumores e distribuição de grupos de dosagem:***

[00224] Para estudos de imageamento *in vivo*, uma linhagem de tumor positivo em LAG3 foi usada. Primeiro, uma linhagem de célula de carcinoma colônico de murino MC38-cOVA/eGFP-mLAG3<sup>-/-</sup>hLAG3<sup>Tg</sup> foi usada. Aqui, as células superexpressam LAG3 humano e ovalbumina de galinha de tamanho natural fundidas com eGFP que foi introduzido pela transdução lentiviral (pLVX EF1a e pLKO SSFV, respectivamente). Para os aloenxertos de tumor MC38-cOVA/eGFP-mLAG3<sup>-/-</sup>hLAG3<sup>Tg</sup>,  $1 \times 10^6$  células foram implantadas subcutaneamente no flanco esquerdo de NCr nus machos (Taconic, Hudson NY). Uma vez que os tumores atingiram um volume médio de 100 a 150 mm<sup>3</sup> (~Dia 7 após a implantação), os camundongos foram randomizados em grupos de 5 e dosados com anticorpos radiorrotulado com  $^{89}\text{Zr}$  de teste ou controle.

***Dosagem e biodistribuição de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1:***

[00225] Para o estudo inicial em camundongos nus carregando tumores MC38/ova/LAG3, os camundongos receberam  $50 \pm 1$  µCi de anticorpo rotulado com  $^{89}\text{Zr}$  com uma dose de proteína de ~0,6 mg/kg. Para os estudos de biodistribuição, os camundongos foram eutanizados 6 dias após a dosagem e o sangue foi coletado via punção cardíaca. Os tumores e tecidos normais foram depois excisados e colocados em tubos de contagem. Dados de contagem para  $^{89}\text{Zr}$  em CPM foram depois coletados medindo-se amostras em



um contador gama automático (Wizard 2470, Perkin Elmer). Todos os tecidos também foram pesados e a dose percentual injetada por grama (%ID/g) foi calculada para cada amostra usando padrões preparados a partir do material injetado.

### **Resultados, Sumário e Conclusão:**

[00226] Neste exemplo, os camundongos NCr carregando tumores MC38/ova/hLAG3 receberam mAb1 anti-LAG3 conjugado a  $^{89}\text{Zr}$  ou anticorpo não ligante em uma dose final de 50  $\mu\text{Ci}$ /camundongo. Os camundongos foram subsequentemente deixados durante 6 dias até que o sangue, tumor e tecidos fossem coletados e a %ID/g para as amostras fosse calculada para todas as amostras. A %ID/g média para cada anticorpo está apresentada na Tabela 9. A partir disto, a captação clara alta em tumores MC38/ova/hLAG3 está evidente em relação aos outros tecidos normais, com captação de tumor de 43,1% sendo significativamente mais alta do que a captação mais alta seguinte de 6,6 %ID/g observada no timo. A especificidade da captação de mAb1 anti-LAG3 dentro do tumor está evidente na captação em tumor significativamente reduzida de 7,8% observada para o anticorpo não ligante.

**Tabela 9:**

AMOSTRA	$^{89}\text{Zr}$ - mAb1		Ab não ligante a $^{89}\text{Zr}$	
	%ID/G MÉDIA	%ID/G DESVIO PADRÃO	%ID/G MÉDIA	%ID/G DESVIO PADRÃO
FÍGADO	0,5	6,2	3,9	0,3
BAÇO	4,2	0,8	6,7	0,8
RIM	5,1	0,8	6,2	1,2
OSSO	4,3	2,1	4,9	1,0
PULMÃO	3,1	2,3	9,3	2,1
CORAÇÃO	2,6	0,9	6,5	2,4
SANGUE	5,9	3,1	15,7	2,6
TIMO	6,7	1,7	12,1	1,8
MC38/ova/LAG3	43,1	9,5	7,8	0,4
INTESTINO DELGADO	1,7	0,5	2,8	0,5

### **Exemplo 6: Localização seletiva de anticorpo anti-LAG3 radiorrotulado para tumores Raji/PBMC em camundongos**

[00227] Este Exemplo descreve o imageamento *in vivo* e

biodistribuição *ex vivo* de um conjugado de DFO-anticorpo anti-LAG3 rotulado com Zircônio-89 em camundongos NSG coimplantados com células Raji e PBMC humana.

[00228] O anticorpo exemplar usado neste Exemplo foi MAb1, compreendendo HCVR/LCVR da SEQ ID NOs: 418/426.

**Implantação de tumores e distribuição de grupos de dosagem:**

[00229] Para demonstrar especificidade do anticorpo radiorrotulado para alvejar LAG3,  $2 \times 10^6$  células Raji e  $5 \times 10^5$  PBMC humanas (Lote 0151029, ReachBio Research Labs) foram coimplantadas no flanco direito de camundongos NSG fêmeas (8 a 10 semanas de idade, Jackson Labs). 14 dias após a implantação de tumor, os camundongos foram randomizados em grupos de 4 e injetados intravenosamente com doses variáveis de proteína de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1.

**Dosagem e imageamento de PET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1:**

[00230] Camundongos portando os tumores de Raji/hPBMC foram injetados com 5, 0,3, 0,1, ou 0,03 mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 no dia 14 após a implantação de tumor. Os camundongos que receberam as doses de 0,1 e 0,03 mg/kg receberam ~30 ou ~9  $\mu\text{Ci}$  de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 radiorrotulado, respectivamente. Os camundongos que receberam 5 ou 0,3 mg/kg de doses de proteína receberam ~30  $\mu\text{Ci}$  de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 radiorrotulado e mAb1 não conjugado com DFO adicional (L5) como suplemento para produzir a dose de proteína total injetada final.

[00231] O imageamento de PET da localização de anticorpo foi avaliado 6 dias depois da administração de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1. Um PET/CT G8 da Sofie Biosciences foi usado para adquirir as imagens de PET/CT (Sofie Biosciences e Perkin Elmer). O instrumento foi pré-calibrado para a detecção de  $^{89}\text{Zr}$  antes da aquisição de imagem. A janela de energia variou de 150 a 650 keV com uma resolução reconstruída de 1,4 mm no centro do campo de visão. Os camundongos sofreram anestesia de indução usando isoflurano e

foram mantidos sob fluxo contínuo de isoflurano durante o imageamento. Imagens estáticas de 10 minutos foram adquiridas usando o software de aquisição G8 e subsequentemente reconstruídas usando os ajustes pré-configurados. Os dados de imagem foram corrigidos quanto ao decaimento e outros parâmetros. As imagens de CT foram adquiridas a seguir da aquisição de PET e subsequentemente corregistradas com as imagens de PET. As imagens foram preparadas usando o software pós-processamento VivoQuant (inviCRO Imaging Services).

**Biodistribuição de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1:**

[00232] Para os estudos de biodistribuição, os camundongos foram eutanizados no ponto de tempo final (6 dias após a administração de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1) e sangue foi coletado via punção cardíaca. Os tumores Raji/hPBMC e tecidos normais foram depois excisados, colocados nos tubos de contagem e pesados. Os dados de contagem para  $^{89}\text{Zr}$  em CPM foram depois coletados medindo-se amostras em um contador gama automático (Wizard 2470, Perkin Elmer). A dose injetada percentual por grama (% ID/g) foi calculada para cada amostra usando padrões preparados a partir do material injetado.

**Resultados, sumário e conclusões:**

[00233] Este estudo demonstra alveijamento específico de antígeno de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 para LAG3 expresso nos linfócitos humanos em tumores Raji/hPBMC subcutâneos cultivados em camundongos NSG. A dose de bloqueio de 5 mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 mostrou captação sanguínea aumentada (% ID/g) e captação de tumor mais baixa (% ID/g) em tumores de Raji/hPBMC comparadas com as doses mais baixas de 0,3, 0,1 e 0,03 mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 (Tabela 10). Além disso, conforme a dose de proteína diminuiu, a razão média de tumor-para-sangue aumentou demonstrando especificidade para Lag-3 *in vivo* (Tabela 10). Além do alveijamento de Lag-3 expresso nos tumores Raji/hPBMC, as doses mais baixas de 0,3, 0,1 e 0,03

mg/kg de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 demonstraram alveijamento para o baço e linfonodos axilares de camundongos que carregam tumor. As imagens PET representativas (Figura 9) no dia 6 após a administração de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 demonstram alveijamento mais alto de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 para o tumor, baço e linfonodos axilares a 0,03 mg/kg dos 5 mg/kg comparados.

[00234] Tabela 10: Biodistribuição *ex vivo* no dia 6 depois da administração de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-mAb1 injetado nas doses de proteína de 5, 0,3, 0,1, ou 0,03 mg/kg nos camundongos NSG carregando tumores Raji/hPBMC. Os valores são mostrados como média e desvio padrão de % ID/g e razões de tumor-para-sangue.

	$^{89}\text{Zr}$ -DFO- mAb1 5 mg/kg		$^{89}\text{Zr}$ -DFO- mAb1 0,3 mg/kg		$^{89}\text{Zr}$ -DFO- mAb1 0,1 mg/kg		$^{89}\text{Zr}$ -DFO- mAb1 0,03 mg/kg	
AMOSTRA	MÉDIA % ID/g	DESVIO PADRÃO % ID/g	% ID/g MÉDIA	% ID/g DESVIO PADRÃO	% ID/g MÉDIA	% ID/g DESVIO PADRÃO	% ID/g MÉDIA	% ID/g DESVIO PADRÃO
Sangue	18,45	1,69	12,17	3,20	8,13	4,28	7,81	5,37
Tumor	20,52	5,34	40,43	8,09	33,26	10,81	48,92	28,53
Timo	7,78	0,64	6,57	2,04	7,98	4,71	3,22	2,43
Coração	5,5	0,45	3,74	0,57	2,79	1,14	2,39	1,47
Pulmões	10,14	0,54	8,30	2,40	9,72	1,63	8,14	1,08
Baço	7,74	0,17	22,32	13,82	103,68	126,79	59,20	40,84
Intestino	1,82	0,23	1,43	0,20	0,80	0,44	1,19	0,23
Fígado	4,51	0,26	5,56	1,16	9,75	3,87	10,75	5,58
Rim	6,73	0,99	6,17	1,28	5,77	1,59	5,49	1,56
Osso	8,78	1,75	8,39	3,10	8,87	2,64	9,83	1,54
Razão de Tumor- para- sangue	1,10	0,21	3,46	1,05	5,44	3,60	9,71	8,27

### Exemplo 7: Quantificação em LC-PRM-MS de LAG3 em Xenoenxertos de Raji/PBMC e Amostras Clínicas

[00235] Amostras de tecido congeladas (tumores Raji/PBMC, baços de camundongo e tecido de melanoma; ver a Figura 12 quanto às fontes e características de tecidos de melanoma) foram lisados com tampão de lise (8 M de ureia em 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  com 1% de RapiGest). Os tecidos foram cortados em pedaços pequenos e foram homogeneizados com 1 mL de tampão de lise em um homogeneizador oscilante de ajuste apertado. O lisado foi incubado sobre gelo durante 30 mins com sonificação durante 30 s a cada

10 mins para se obter extração de proteína completa. O lisado foi centrifugado a 14.000g durante 10 mins. A concentração de proteína foi medida pelo ensaio de BCA. Cada amostra foi diluída a 1 mg/mL depois foi centrifugada a 14.000g durante 10 mins e foi armazenada em alíquotas a -80 °C.

[00236] Lisado de baço de camundongo NSG não implantado foi usado como as matrizes substitutas para gerar a curva padrão para a quantificação de LAG3. LAG3.Fc foi reforçado em cada um de 100 µg de lisado de baço de camundongo em uma concentração final variando de 0,39 a 50 ng/mg de proteína (diluição em série de 1:2). Padrões, xenoenxertos e lisados de melanoma clínico foram precipitados em 900 µL de acetona fria durante a noite e depois desnaturados em 90 µL de tampão de Ureia 8 M/TCEP a 37°C durante 1 h. Peptídeo LAG3 humano pesadamente rotulado (FVWSSLDTPSQR<sup>13</sup>C6<sup>15</sup>N4) foi adicionado a todas as amostras como padrão interno. Os padrões e amostras de teste foram alquiladas com IAA na temperatura ambiente durante 30 min e digeridas pela lys-C (1:100 p/p) durante 4 h depois pela tripsina (1:20 p/p) durante a noite a 37°C. As amostras foram extintas com 10% de FA para atingir um Vol. final de 100 µL.

[00237] Cada amostra processada (2 µL) foi injetada em uma coluna sílica C18 nano pré-equilibrada e foi separada por uma coluna de separação fácil C18 nano. A taxa de fluxo foi de 250 nL/min (Fase Móvel A: água:ácido fórmico/100:0,1 [V:V] e Fase Móvel B: acetonitrila:ácido fórmico/100:0,1 [V:V]). O tempo de retenção e a área de pico foram determinados usando o software Skyline. A curva de calibração foi gerada plotando-se a razão de área de pico do padrão de referência LAG3.Fc (peptídeo LAG3 não rotulado FVWSSLDTPSQR<sup>12</sup>C6<sup>14</sup>N4 gerado pela digestão triptica de hLAG3) para o padrão interno (peptídeo LAG3 rotulado com o isótopo estável). A concentração de LAG3 em cada amostra foi calculada usando a regressão linear. A concentração mais baixa do padrão de referência LAG3 (0,39 ng/mg de proteína) foi dentro da faixa dinâmica do ensaio e foi definido como o

limite inferior do ensaio de quantificação.

### Sumário dos resultados e conclusões:

[00238] A quantificação de LAG3 foi realizada sobre amostras de tecido de 4 dos xenoenxertos de PBMC/Raji de 27 dias, 5 xenoenxertos de 15 dias depois da implantação de tumor e 10 amostras clínicas de melanoma. Os pesos de tecido, as quantidades de proteína, rendimento de extração e expressão de LAG3 foram listados na Tabela 11. Bmax foi calculado com base na seguinte equação com uma estimativa da densidade do tumor a 1 g/mL.

$$B_{\max} \text{ (nM)} = \frac{\text{LAG3 (ng/mg de proteína)} \times \text{Quantidade Total de Proteína (mg)} \times 10E6}{5,74 \times 10E4 \times \text{Peso do Tumor (mg)}}$$

[00239] Cinco de 10 amostras de tecido de melanoma foram detectadas como LAG3 positivas com um nível de expressão média de  $2,52 \pm 1,87$  nM. Este nível de expressão é similar ao modelo Raji/PBMC em 27 dias ( $3,79 \pm 1,93$  nM) e em 15 dias ( $6,06 \pm 4,04$  nM). Ver a Tabela 11 e também Figura 10.

Tabela 11:

		Peso do Tecido (mg)	Quantidade de Proteína Total (mg)	% de proteína	de Lag3 (ng/mg de proteína)	Bmax (nM)
Tecido de Melanoma	131815T2(3)	290	9,1	3,14%	BLQ	BLQ
	131719T2(3)	230	17,6	7,65%	BLQ	BLQ
	13841T2(1)	220	20,1	9,14%	0,73	1,16
	13788T2(4)	250	24,1	9,64%	1,04	1,75
	13765T2(2)	250	19,4	7,76%	BLQ	BLQ
	131778T2(5)	180	9,2	5,11%	BLQ	BLQ
	131291T2(1)	240	17,4	7,25%	0,84	1,06
	131086T6(1)	180	9,32	5,18%	BLQ	BLQ
	13547T2(1)	220	16,1	7,32%	2,42	3,08
	13524T2(7)	200	13	6,50%	4,90	5,53
	Média	226	15,5	6,87%	1,99	2,52
	DP	34	5,2	1,96%	1,76	1,87
Xenoenxerto de Raji/PBMC (27 Dias)	85100_0	419,5	20,9	4,98%	4,74	4,10
	85101_8	248,9	10,3	4,14%	1,58	1,14
	85104_23	256,5	9,74	3,80%	6,24	4,12
	85103_19	112,5	5,92	5,26%	6,32	5,78
	Média	259	11,72	4,54%	4,72	3,79
	DP	126	6,43	0,69%	2,21	1,93
Xenoenxerto de Raji/PBMC (15 Dias)	213_1	140	8,8	6,29%	11,46	12,5
	213_2	260	10,14	3,90%	4,54	3,08
	213_3	230	9,3	4,04%	7,22	5,09
	213_4	160	7,9	4,94%	2,95	2,54

	213_5	50	2,8	5,60%	7,23	7,05
	Média	168	7,8	4,95%	6,68	6,06
	DP	82	6,43	0,69%	2,21	1,93

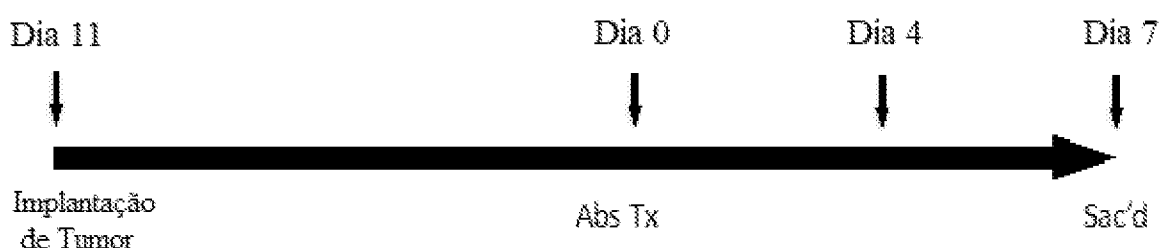
**Exemplo 8: Suprarregulação da expressão de LAG-3 e PD-1 humanos nas células T no microambiente tumoral pela terapia com REGN2810 (Ab anti-PD-1 humano) e mAb1 (Ab anti-LAG-3 humano)**

[00240] Este experimento foi realizado para avaliar a modulação dos níveis de expressão de LAG-3 e PD-1 humanos nas células T no microambiente tumoral no tratamento com REGN2810 e mAb1 usando camundongos imunocompetentes duplamente humanizados PD-1<sup>hu/hu</sup>/LAG-3<sup>hu/hu</sup> de propriedade da Regeneron. A linhagem de célula de tumor usada neste experimento é uma linhagem de célula de carcinoma colônico de murino MC38 (obtida da NCI em Frederick, MD, Laboratory of Tumour Immunology and Biology), que foi engendrada internamente para expressar ovalbumina de galinha de tamanho natural fundida com eGFP, assim aqui aludida como MC38-cOVA/eGFP. O nível de expressão de LAG-3 humano foi avaliado *ex vivo* nas células T tanto CD4 quanto CD8 de tumores enzimaticamente dissociados extraídos de camundongos que carregam tumor duplamente humanizado. Todo tingimento superficial foi realizado com fluorocromo comercialmente disponível diretamente conjugado aos anticorpos (anticorpo anti-LAG-3 humano: eBioscience, Clone 3DS223H; anticorpo anti-PD-1 humano: BioLegend, Clone EH12.2H7), seguindo o protocolo padrão. Em resumo, as células de tumor foram lavadas com PBS uma vez, lavadas com tampão de tingimento gelado uma vez, tingidas com fluorocromo comercialmente disponível diretamente conjugado ao anticorpo anti-PD-1 humano ou anti-LAG-3 humano em tampão de tingimento durante 30 min em gelo no escuro, lavado com 2 ml de PBS mais uma vez. Corante fixável eFluor506 também foi incluído seguindo o protocolo do fabricante (eBioscience). As amostras foram adquiridas no BD FACSCanto II® IVD10 equipado com DIVA v8. Os dados foram analisados adicionalmente com FlowJo v10.0.6 ou a versão posterior.

### Sumário e conclusões dos resultados:

[00241] A Tabela 12 provê uma apresentação esquemática do regime de dosagem terapêutica nos cenários de tumor pré-clínico.  $1 \times 10^6$  células MC38-cOVA/eGFP foram implantadas s.c. em camundongos imunocompetentes duplamente humanizados PD-1<sup>hu/hu</sup>/LAG-3<sup>hu/hu</sup>. Em torno do Dia 11, os camundongos foram randomizados em quatro grupos com volumes médios de tumor de  $\sim 100 \text{ mm}^3$  e iniciaram o tratamento como indicado. As amostras de tumor foram coletadas 3 dias depois da segunda dose.

**Tabela 12: Apresentação esquemática de regime terapêutico de dosagem.**



Grupo	Tratamento	# Camundongo
Isótipo	25 mg/kg, 2x semana, 2 doses, IP	10
REGN2810 (PD-1)	10 mg/kg, 2x semana, 3 doses, IP	12
mAb1 (anti-LAG-3 humano)	25 mg/kg, 2x semana, 2 doses, IP	12
REGN2810 + mAb1	10 mg/kg + 25mg/kg, 2x semana, 2 doses, IP	12

[00242] Como mostrado na Tabela 13, a combinação de anti-PD-1 humano (REGN2810) e anti-LAG-3 humano (mAb1) significativamente inibiu o crescimento de tumor no modelo de tumor singênico MC38-cOVA/eGFP em camundongos duplamente humanizados. Os camundongos que carregam tumor (tamanhos de tumor de cerca de  $100 \text{ mm}^3$ ) foram tratados com um anticorpo de controle de isótipo hIgG4, REGN2810 (anti-PD-1 humano, hIgG4), mAb1 (anti-LAG-3 humano, hIgG4s) e combinação de REGN2810 e mAb1, duas vezes por semana para duas doses e os tamanhos de tumor foram



medidos pelo calibre. O volume de tumor foi calculado como  $V = L \times W^2/2$ . No grupo de controle, os tamanhos de tumor variaram de 300 a 869 mm<sup>3</sup> com valor médio de 548 mm<sup>3</sup>. O grupo tratado com REGN2810 mostrou tamanhos de tumor reduzidos (121 a 721 mm<sup>3</sup> com média em 466 mm<sup>3</sup>), mas as diferenças não atingiram significância estatística. Ao passo que o grupo tratado com mAb1 também não apresentou nenhuma diferença do grupo de controle de isótipo (203 a 721 mm<sup>3</sup> com média em 592 mm<sup>3</sup>), o tratamento de combinação significativamente retardou o crescimento de tumor (113 a 621 mm<sup>3</sup> com média em 289 mm<sup>3</sup>,  $p < 0,01$ ).

**[00243] Tabela 13: Anti-PD-1 humano (REGN2810) e anti-LAG-3 humano (mAb1) significativamente inibiu o crescimento de tumor em modelo de tumor singênico MC38-cOVA/GFP em camundongos duplamente humanizados**

	Iso**	chPD-1	chLAG-3**	Combo
Camundongo/grupo	10	12	12	12
Mínimo	299,9	120,9	202,6	113,4
Percentil de 25%	437,6	321,3	426,9	192,6
Média	548,4	463,5	592,1	289,1
Percentil de 75%	617,6	597,8	631,1	349,7
Máximo	868,7	710,6	760,7	631,4

**[00244]** Ab anti-PD-1 humano REGN2810 e mAb1 anti-LAG-3 humano respectivamente aumentaram as células T LAG-3+ e células T PD-1+ no microambiente tumoral, como pode ser observado na Figura 11. Os tumores de camundongos individuais foram dissociados pela GentleMACs (Miltenyi Biotech) de acordo com o protocolo do Fabricante. As amostras foram tingidas com um painel de Abs e analisadas pelo citômetro de fluxo. Os dados apresentados foram pré-ativados em FSC/SSC, viabilidade, singletos, células CD45+CD3+, depois adicionalmente ativados nas células T CD4 ou CD8. A expressão de LAG-3 humano e PD-1 humano foi avaliada entre grupos diferentes. Para eliminar a possível competição cruzada de Ab, os grupos tratados com REGN2810 e combinação foram excluídos da análise de

PD-1 humano. Similarmente, os grupos tratados com mAb1 e combinação também foram excluídos da análise de LAG-3 humano. Depois de duas doses terapêuticas, REGN2810 significativamente aumentou a frequência de células T LAG-3 humano+ CD4 no microambiente tumoral em ~ 24% ( $p=0,0006$ ), embora não pareça ter um papel modulador direto para a expressão de LAG-3 sobre as células T CD8 com o regime de dosagem testado. Interessantemente, mAb1 também aumentou a frequência de PD-1 humano+ CD4 ( $p=0,0026$ ) e células T CD8 ( $p=0,0249$ ) no microambiente tumoral em ~ 28%, respectivamente. Ver a Figura 11.

[00245] Os resultados dos estudos aqui realizados claramente demonstram que o anticorpo anti-LAG3 rotulado com  $^{89}\text{Zr}$  pode significante e especificamente localizar aos tumores. Pode-se prever um cenário onde o anticorpo anti-LAG3 é usado na seleção de pacientes com tumores positivos em LAG3 para o tratamento subsequente com inibidores de LAG3, sozinhos ou em combinação com outros produtos terapêuticos anticâncer incluindo inibidores do eixo de sinalização de PD-1/PD-L1.

#### **Exemplo 9: Processo de fabricação ampliado para produzir conjugados de DFO-anticorpo anti-LAG3**

[00246] Este exemplo detalha o processo de fabricação ampliado para preparar o anticorpo anti-LAG3 para ser adequado para a radiorrotulação pela fixação de p-SCN-bn-Desferoxamina (DFO) ao anticorpo anti-LAG3 (mAb, H4sH15482P) aqui descrito: (1) processos de ultrafiltração e diafiltração (UFDF) antes da conjugação de mAb remove excipientes que inibem o processo de conjugação; (2) a seguir da UFDF na pré-conjugação, a conjugação do mAb com p-SCN-Bn-desferoxamina é realizada para produzir conjugados de DFO-mAb; e (3) uma UFDF pós-conjugação para remover sais residuais provê uma concentração, nível de excipiente e pH adequados do anticorpo monoclonal conjugado. Os conjugados de DFO-mAb resultantes são depois providos em um estado tamponado com estabilidade melhorada

para formulação subsequente.

### **(1) Ultrafiltração e Diafiltração na Pré-Conjugação (UFDF)**

[00247] 100 g de mAb foi trocado de tampão em uma solução tampão de acetato a 5 mM tendo um pH de 5,50 usando uma membrana Sius Prostream (TangenX Technology Corporation) (capacidade da membrana de  $\leq 500 \text{ g/m}^2$ ) para remover sais residuais antes da conjugação. O volume de processo foi reduzido para concentrar ainda mais o anticorpo, depois o anticorpo foi filtrado estéril usando uma membrana Sartopore 2 (Sartorius) tendo um tamanho de poro de 0,45/0,2  $\mu\text{m}$  (camada dupla de PES heterogênea) ou equivalente. A temperatura do tampão de acetato foi mantida em uma temperatura alvo de  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . As soluções foram bem misturadas.

### **(2) Conjugação**

[00248] O anticorpo concentrado e filtrado (20 g) foi transferido em um vaso de conjugação contendo um sistema de tampão de carbonato livre de amina (56 mM de Carbonato, 167 mM de Cloreto de Sódio, pH 9,40) resultando em níveis negligenciáveis de acetato residual. DFO (25 mM de p-SCN-Bn-Desferoxamina) foi solubilizado em DMSO e adicionado ao vaso de conjugação, junto com DMSO adicional tal que o DMSO estivesse presente em uma quantidade final de 5%. DFO foi adicionado em excesso molar em uma razão de 4,5:1 de DFO para mAb. O volume de reação total equivaleu a 2,0 L. O sistema de tampão foi misturado por toda a adição dos ingredientes de reação e por todo o tempo de reação.

[00249] A temperatura de reação foi controlada por tempo especificado usando-se uma equação que relaciona a temperatura com o tempo de reação. Neste caso, a temperatura de reação foi mantida a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 180 minutos. A reação foi extinta pela adição de ácido acético a 2M (23 mL/L), resultando na solução tendo um pH de 6.

### **(3) UFDF Pós-Conjugação**

[00250] Depois da etapa de conjugação, a solução de conjugação de

DFO-mAb extinta foi trocada de tampão em tampão de histidina (10 mM de Histidina, pH 5,50 com 0,0005% (p/v) de polissorbato 80 super refinado adicionado como um protetor de cisalhamento) para remover sais residuais de processamento, DMSO e DFO não reagido. Uma vez diafiltrada, a solução foi depois concentrada e subsequentemente formulada. O tampão de histidina foi selecionado para armazenagem de longa duração de proteína a -80°C. A mesma membrana Sius Prostream mencionada na etapa (1) foi usada na etapa de UFDF final. A solução de conjugado DFO-mAb concentrada resultante foi filtrada estéril usando o filtro Sartopore 2 mencionado acima.

[00251] A determinação de UV-DAR (alvo de 1,5) e a concentração de proteína foi realizada como descrito no Exemplo 2.

**Tabela 14. Coeficientes de extinção molar e Peso Molecular**

Anticorpo	PM (g mol <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{280}$ (L g <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{252}$ (L g <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
H4sH15482P	145709	223400	87077

**Exemplo 10: Imageamento ImmunoPET de LAG3 em tumores usando um conjugado de <sup>89</sup>Zr-DFO-anticorpo anti-LAG3 em pacientes com melanoma metastático**

[00252] O objetivo primário deste estudo é determinar a segurança e tolerabilidade do conjugado de <sup>89</sup>Zr-DFO-anticorpo anti-LAG3, em que o anticorpo anti-LAG3 usado no conjugado radiorrotulado é H4sH15482P. As medições de resultado monitoram os eventos adversos e testes de laboratório de rotina quanto à segurança.

[00253] Os objetivos secundários do estudo são:

- **Estudo parte A:** Qualificar <sup>89</sup>Zr-DFO-anti-LAG3 PET como um biomarcador para a avaliação da expressão de LAG3 em tumores. Isto será realizado avaliando-se a segurança do traçador <sup>89</sup>Zr-DFO-anti-LAG3 PET, determinar dose de massa de traçador ideal e tempo de imageamento pós-injeção ideal, estabelecer a relação do sinal PET do tumor com a expressão de LAG3 com base em tecido e avaliar a dosimetria em pacientes. A Parte A compreende um planejamento de dose de traçador sequencial, com

biópsia de tumor. Imageamento e coletas de sangue nos dias 1, 4 e 7 após a injeção de traçador para permitir reuniões de sangue SUV com cálculo subsequente de tumor: as razões de sangue no momento do imageamento; dosimetria clínica com base na dose absorvida de radiação pelo tecido e dose eficaz calculada a partir dos dados de aquisição de imagem de PET e concentração de atividade do traçador no sangue; valores de captação padronizada (concentração da atividade corrigida de decaimento de SUVs no tecido alvo dividido pela concentração de atividade média no corpo no momento da injeção) através das regiões de tumor de interesse; SUVs máximos dentro das regiões de tumor de interesse (ROIs) ( $SUV_{max}$ ); e concentração plasmática da atividade de traçador, com cálculo da área sob a curva ( $AUC_{0-7 \text{ dias}}$ ).

[00254]        • **Estudo parte B:** Para explorar a construção e validade de critério de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 PET pela correlação do sinal de PET com a expressão com base em tecido de LAG3 e resultados clínicos (taxa de resposta objetiva e sobrevivência livre de progressão) depois da terapia IO. A sequência de varredura iPET e as biópsias de tumor são realizadas antes e depois do tratamento com padrão de imunoterapias de cuidado selecionadas dos seguintes: nivolumab, ipilimumab, pembrolizumab e combinações como permitido pelo rótulo.

[00255]        A utilidade do traçador imuno-PET (iPET) pode ser inicialmente avaliada testando-se quanto à capacidade para detectar a presença de tumores LAG3, assim como mudanças no sinal de LAG3 induzido por uma imunoterapia estabelecida e explorando-se a correlação do sinal de iPET com resultados clínicos (validação de critério: contra resultados biológica e clinicamente significativos).

[00256]        Uma dose segura, de massa ideal de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 pode ser identificada que mostra captação de tumor adequada pelo PET, PK traçador e dosimetria. A seleção de três níveis de dose de massa de traçador

está fundamentada no imageamento de xenoenxerto pré-clínico de camundongo e estudos de biodistribuição e nos dados clínicos e pré-clínicos usando anticorpos terapêuticos anti-LAG3 não rotulados. A escalação de dose de massa planejada é de 2 mg, 5 mg e 10 mg. O método deve usar doses que sejam subterapêuticas ou farmacologicamente inertes, de modo a não interferir com a terapia antitumoral prospectiva.

[00257] A dose de massa ideal demonstrará SUV de tumor, SUV máximo ( $SUV_{max}$ ) dentro da região de lesão de tumor de interesse (ROI) e razão tumor:sangue todos  $>1$  (e idealmente uma razão de tumor-sangue de 3 a 4) em pelo menos uma lesão (idealmente em lesão  $>1$ , em pacientes com diversas metástases).

[00258] A atividade de traçador no plasma (ou soro) e/ou reunião de sangue SUV (a atividade PK mede para este estudo) serão detectáveis durante toda a janela de imageamento de 7 dias, a seguir da dosagem, sugerindo disponibilidade adequada de traçador para compartimentalizar em lesões tumorais. As razões de sinal de tumor e sangue serão fundamentadas nos SUVs, embora outras unidades de concentração de atividade possam ser usadas. O mesmo aplica-se para as medições de concentração da atividade de sangue, que seriam relatadas em termos de unidades absolutas ou unidades normalizadas.

[00259] A intensidade de sinal LAG3 PET em uma lesão biopsiada covariará com o grau de expressão de LAG3 na biópsia tecidual usando medidas semiquantitativas.

[00260] O sinal de LAG3 PET autorradiográfico correlacionar-se-á espacialmente com a expressão de LAG3 em amostras de biópsia de tecido.

[00261] A intensidade do sinal de LAG3 PET aumentará a seguir do tratamento com uma imunoterapia.

[00262] O aumento da intensidade de sinal de LAG3 PET correlacionar-se-á com a resposta a seguir do tratamento com uma

imunoterapia.

[00263] Adicionalmente, objetivos exploratórios e medidas de resultado incluem determinar a expressão de LAG3 em biópsias de tecido em correlação com a captação de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 pelo tumor usando imuno-histoquímica, RNAscope, espectrometria de massa com cromatografia líquida (LC/MS) e autorradiografia. Apenas para a parte B, objetivos exploratórios incluem mudanças de medição no sinal de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 depois do tratamento e correlação do sinal de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 com resultados clínicos depois do tratamento. As medidas de resultados incluem SUV, SUVmax, razão de tumor:sangue e resultados clínicos seguintes ao tratamento de imunoterapia (CT serial para o propósito de cálculo da situação de respondedor usando RECIST 1.1 e o volume do tumor), a taxa de resposta objetiva e sobrevivência livre de progressão.

### **População Alvo de Paciente**

[00264] A população alvo consistirá em pacientes com 18 anos de idade ou mais velhos com melanoma metastático avançado, diagnóstico histológica ou citologicamente confirmado, com pelo menos uma lesão passível de biópsia. O paciente deve ter uma situação de desempenho no ECOG de menos do que ou igual a 2, uma expectativa de vida antecipada de pelo menos 3 meses e função adequada de órgão e medula óssea.

[00265] A inclusão de pacientes com uma indicação que tenha uma alta prevalência do alvo sustentará a avaliação de localização de tumor LAG3 iPET que é um resultado chave do estudo. A detecção e correlação de expressão de LAG3 pós-imunoterapia com resultados clínicos requer uma população de pacientes com taxas de resposta clínica bem caracterizadas às imunoterapias. Os pacientes com melanoma metastático representam uma população de paciente com taxas de resposta estabelecidas aos inibidores de ponto de checagem assim como os altos níveis de prevalência e expressão de LAG3.

**Planejamento de Estudo**

[00266] O estudo compreende a parte A (validação de construção) e parte B (validação de critério). A duração do estudo é de 9 semanas para a Parte A (4 semanas de triagem, 1 semana de dosagem de traçador, varreduras e biópsia, 4 semanas de acompanhamento de segurança) e 18 semanas para a Parte B (4 semanas de triagem, 1 semana de dosagem de traçador, varreduras e biópsia, até 8 semanas na imunoterapia, 1 semana de segunda dose de traçador e varredura, 4 semanas de acompanhamento de segurança).

**Parte A**

[00267] A Parte A é um estudo de descoberta de dose no qual os pacientes recebem uma única dose de traçador, seguida pelas varreduras em série e uma biópsia em um período de 7 dias. Uma vez que a sequência de varredura e a biópsia são completadas, os sujeitos podem ser imediatamente tratados com um padrão de regime de imunoterapia de cuidado (anti-PD-1 sozinho ou em combinação com anti-CTLA4 de acordo com a indicação rotulada).

**Grupo de Dosagem na Parte A**

[00268] A Parte A compreende três grupos de dose sequenciais, consistindo em 3 pacientes, com potencial para expandir o grupo para um total de 6 pacientes (planejamento 3+3). As decisões de escalação de dose serão informadas por a) segurança e b) avaliação de positividade de iPET. A toxicidade limitante da dose (DLT) é definida como um evento adverso (AE) Grau 3 ou superior (NTCAE) relacionado com ou possivelmente relacionado com  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3, uma semana a seguir da administração de traçador. Para AEs de lab hematológico, DLT é definido como Grau 4 ou superior. A positividade da captação de tumor/localização de tumor é definida por uma razão de tumor:sangue maior do que 1. PK adequada é definida pelo SUV no sangue na faixa de 1 a 5 em tempo de imageamento ideal (4 ou 7 dias após a injeção).



[00269] A expansão de grupo para 6 pacientes ocorrerá se qualquer uma das seguintes condições forem atingidas: (a) exatamente 1 paciente experiencia um DLT ou (b) pelo menos 1 paciente dos 3 mostra localização de tumor e PK adequado e não mais do que 1 paciente experiencia um DLT.

[00270] Na conclusão de um grupo de 3 ou 6 sujeitos, a escalação de dose ocorrerá em uma dose disponível mais alta se menos do que 3 pacientes em um grupo expandido experienciou um DLT.

[00271] A Parte A do estudo será interrompida se qualquer uma das seguintes condições forem atingidas (regras de interrupção da Parte A): mais do que 1 paciente em um grupo experiencie um DLT; mais do que 3 pacientes mostrem localização de tumor visual e PK adequada em cada um de dois grupos expandidos consecutivos; ou nenhuma das doses mais altas estiverem disponíveis para escalação.

[00272] Ao atingir uma regra de interrupção da Parte A, a dose da Parte B será selecionada como segue: a) se dois ou três grupos expandidos mostram mais do que 3 pacientes com localização de tumor e PK adequada, então o grupo de dose com localização de tumor em mais pacientes, ou razões de tumor:sangue mais altas, serão escolhidos. Quando estes são similares entre grupos, a dose mais baixa será escolhida. b) se um grupo mostra mais do que 3 pacientes com localização de tumor e PK adequada, esta dose será escolhida. c) se nenhum dos grupos mostram mais do que 3 pacientes com localização de tumor e PK adequada, o estudo terminará sem progressão para a Parte B.

## **Parte B**

[00273] A Parte B medirá o sinal de LAG3 iPET na dose de traçador e ponto de tempo após injeção definidos (determinados na parte A), tanto a pré- quanto a pós-imunoterapia para avaliar a hipótese que envolve o papel de LAG3 como um indicador da resposta inflamatório de tumor (objetivos exploratórios). Todos os pacientes na Parte B receberá a dose de massa de

traçador ideal e a cronometragem de imageamento após a injeção como identificado na Parte A.

[00274] Os pacientes da Parte B receberão varredura de LAG3 iPET na linha de base assim como uma biópsia antes da terapia. Os pacientes depois receberão um padrão de imunoterapia de cuidado (correntemente estes são bloqueadores do caminho de PD-1 e CTLA-4 com base em anticorpo monoclonal), de acordo com o rótulo. Quatro a oito semanas mais tarde uma varredura de iPET adicional será empreendida seguida por uma segunda biópsia se praticável.

[00275] Os pacientes na Parte A que receberam a dose de massa de traçador ideal e obtiveram qualidade de varredura adequada podem ser elegíveis para a Parte B e recebem um total de duas injeções de traçador iPET. O número total de sujeitos na Parte B (incluindo aqueles que entram da Parte A) não excederá 20.

### **Considerações de Biópsia**

[00276] As lesões serão selecionadas quanto à biópsia com base na acessibilidade e tamanho (tipicamente pelo menos 20 mm de diâmetro). Todos os pacientes passarão por uma biópsia de linha de base no último dia do primeiro conjunto de varreduras de iPET, independente de se o estudo de iPET é positivo ou não. Deste modo, os tecidos de pacientes com uma ampla faixa de expressão tecidual de LAG3 serão coletados para correlação com o sinal de LAG3, incluindo pacientes negativos. A biópsia será programada não mais tarde do que 7 dias da data de injeção de modo a minimizar a demora da terapia para o paciente.

[00277] Uma sequência de avaliações que iniciam com uma biópsia seguida pela dosagem de traçador e varreduras e depois o início da terapia pode ser preferível por razões práticas.

[00278] Para a Parte B, uma segunda biópsia depois da segunda varredura pode ser empreendida se praticável e será opcional. As biópsias

sequenciais serão tiradas do mesmo local se praticável.

[00279] Estudos de autorradiografia serão realizados em um subconjunto de tumores biopsiados que são positivos na varredura de iPET, com fatias adjacentes tingidas contra LAG3.

### **Intervenções do Estudo**

#### **Parte A**

[00280] A seguir da triagem, cada sujeito receberá uma dose de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 seguida por três varreduras de iPET sequenciais em 6 a 7 dias. A dose de partida será de 2 mg, como determinado a partir dos estudos e modelagem com animal. Não mais tarde do que 1 dia depois da última varredura de iPET, o sujeito passará por biópsia orientada pela radiologia. Se disponível, tecido tumoral da biópsia arquivado também será analisado pela IHC quanto à expressão de LAG3.

[00281] Para a Parte A, a biópsia é opcional, visto que nem todos os sujeitos receberão a dose de traçador ideal eventualmente identificada.

[00282] A decisão para o progresso para a Parte B será tomada com base nos dados da Parte A e taxa de recrutamento.

#### **Parte B**

[00283] A seguir da triagem, cada paciente com melanoma receberá um  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-anti-LAG3 na dose de massa otimizada (da Parte A) seguido pela varredura de PET no ponto de tempo após a injeção ideal (da Parte A). Depois, não mais tarde do que 1 dia depois do imageamento de iPET, o sujeito passará por biópsia orientada pela radiologia de uma lesão. Subsequentemente, o paciente será tratado, rótulo aberto, com regimes de imunoterapia aprovados disponíveis (dosado como para o rótulo). Os sujeitos receberão uma segunda varredura 4 a 8 semanas depois do começo da imunoterapia. Uma segunda biópsia depois da segunda varredura pode ser empreendida se praticável e será opcional.

[00284] Todos os pacientes serão triados por uma varredura de  $^{18}\text{F}$ -

FDG PET/CT. A porção CT da varredura PET/CT deve ser de qualidade de diagnóstico ou uma varredura de CT de diagnóstico adquirida durante o período de triagem deve estar disponível para avaliar a localização e dimensões de lesões. Estas varreduras serão usadas para avaliar as lesões quanto à atividade metabólica/viabilidade e dimensões apropriadas.

[00285] As modalidades e exemplos descritos acima são intencionados a serem meramente ilustrativos e não limitantes. Aqueles versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de averiguar usando não mais do que experimentação de rotina, numerosos equivalentes de compostos, materiais e procedimentos específicos. Todos de tais equivalentes são considerados estar dentro do escopo e são abrangidos pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES:

1. Conjugado de anticorpo radiorrotulado, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que liga o gene 3 de ativação de linfócito (LAG3) e um emissor de pósitron.

2. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma porção quelante.

3. Conjugado de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo são covalentemente ligados a uma ou mais porções da fórmula (A):



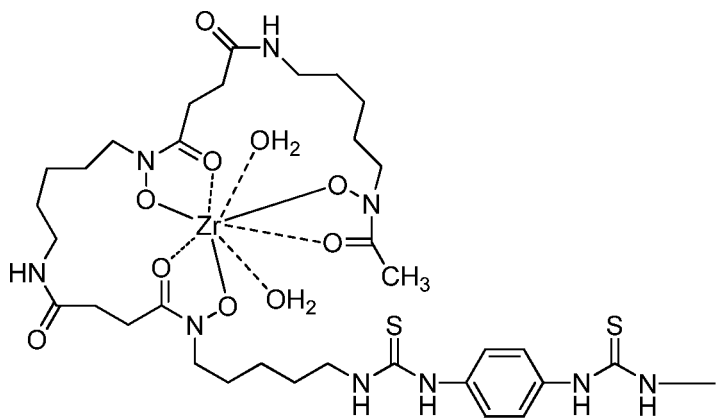
(A)

em que L é uma porção quelante; M é um emissor de pósitron; e z, independentemente em cada ocorrência, é 0 ou 1; e em que pelo menos um de z é 1.

4. Conjugado de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a porção quelante compreende desferrioxamina.

5. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o emissor de pósitron é  $^{89}\text{Zr}$ .

6. Conjugado de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que -L-M é



7. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo são covalentemente ligados a uma, duas, ou três porções da fórmula (A).

8. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo tem uma ou mais propriedades selecionadas a partir do grupo consistindo em:

(a) liga LAG3 monomérico humano com uma constante de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) de menos do que cerca de 8 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37°C;

(b) liga LAG3 monomérico humano com um  $K_D$  menor do que cerca de 10 nM em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25°C;

(c) liga LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  de menos do que cerca de 1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37°C; e

(d) liga LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  menor do que cerca de 1,1 nM em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25°C.

9. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDRs) em uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a HCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538, e 554; e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDRs) em uma região variável de cadeia leve (LCVR), em que a LCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo

consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546, e 562.

10. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada (HCDR)-1 compreendendo a SEQ ID NO: 420; uma HCDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 422; e uma HCDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 424; uma região determinante de complementaridade de cadeia leve (LCDR)-1 compreendendo a SEQ ID NO: 428; uma LCDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 430; e uma LCDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 432.

11. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende três CDRs em uma HCVR da SEQ ID NO: 418; e três CDRs em uma LCVR da SEQ ID NO: 426.

12. Método para imageamento de um tecido que expressa LAG3, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 ao tecido; e visualizar a expressão de LAG3 pelo imageamento de tomografia de emissão de pósitron (PET).

13. Método para tratar um tumor, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) selecionar um sujeito com um tumor sólido;
- (b) determinar que o tumor sólido compreende células positivas em LAG3, compreendendo (i) administrar um conjugado de anticorpo radiorrotulado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 ao sujeito em necessidade do mesmo; e (ii) imagear a localização do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor pelo imageamento de

tomografia de emissão de pósitron (PET), em que a presença do conjugado de anticorpo radiorrotulado no tumor indica que o tumor compreende células positivas em LAG3; e

(c) administrar uma ou mais doses de uma terapia antitumoral ao sujeito em necessidade do mesmo.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a terapia antitumoral é selecionada a partir do grupo consistindo em um inibidor de LAG3, um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1, um inibidor de CTLA-4, um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T, um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um Inibidor de Ang2, um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um inibidor de CD20, um anticorpo para um antígeno específico de tumor, uma vacina contra o câncer, um anticorpo biespecífico, uma citotoxina, um agente quimioterapêutico, ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R, um inibidor de IL-4R, um inibidor de IL-10, IL-2, IL-7, IL-21, IL-15, e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC).

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a terapia antitumoral é selecionada a partir do grupo consistindo em um anticorpo anti-LAG3, REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105, REGN3504, ipilimumab, um anticorpo anti-CD-28, um anticorpo anti-2B4, um anticorpo anti-LY108, um anticorpo anti-LAIR1, um anticorpo anti-ICOS, um anticorpo anti-CD160, um anticorpo anti-VISTA, aflibercept, bevacizumab, ranibizumab, sunitinib, sorafenib, pazopanib, nesvacumab, erlotinib, cetuximab, rituximab, um anticorpo anti-CA9, um anticorpo anti-CA125, um anticorpo anti-antígeno 3 associado a



melanoma (MAGE3), um anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário (CEA) , um anticorpo anti-vimentina, um anticorpo anti-tumor-M2-PK, um anticorpo anti-antígeno específico da próstata (PSA), um anticorpo anti-mucina-1, um anticorpo anti-MART-1, um anticorpo anti-CA19-9, bacilo Calmette-Guerin, um anticorpo biespecífico CD3xCD20, um anticorpo biespecífico PSMAxCD3, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel, vincristina, ciclofosfamida, radioterapia, sarilumab, dupilumab, ADC anti-CD19-DM4, e ADC anti-DS6-DM4.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de que a terapia antitumoral é selecionada a partir do grupo consistindo em um anticorpo anti-LAG3 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a terapia antitumoral é um anticorpo anti-LAG3 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDRs) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDRs) dentro do par de sequências da região variável de cadeia pesada (HCVR)/região variável de cadeia leve (LCVR) selecionado a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546, e 554/562.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado

pelo fato de que o anticorpo anti-LAG3 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três HCDRs e três LCDRs selecionadas a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4/ 6/ 8/ 12/ 14/ 16, 20/ 22/ 24/ 28/ 30/ 32, 36/ 38/ 40/ 44/ 46/ 48, 52/ 54/ 56/ 60/ 62/ 64, 68/ 70/ 72/ 76/ 78/ 80, 84/ 86/ 88/ 92/ 94/ 96, 100/ 102/ 104/ 108/ 110/ 112, 116/ 118/ 120/ 124/ 126/ 128, 132/ 134/ 136/ 140/ 142/ 144, 148/ 150/ 152/ 156/ 158/ 160, 164/ 166/ 168/ 172/ 174/ 176, 180/ 182/ 184/ 188/ 190/ 192, 196/ 198/ 200/ 204/ 206/ 208, 212/ 214/ 216/ 220/ 222/ 224, 228/ 230/ 232/ 236/ 238/ 240, 244/ 246/ 248/ 252/ 254/ 256, 260/ 262/ 264/ 268/ 270/ 272, 276/ 278/ 280/ 284/ 286/ 288, 292/ 294/ 296/ 300/ 302/ 304, 308/ 310/ 312/ 316/ 318/ 320, 324/ 326/ 328/ 332/ 334/ 336, 340/ 342/ 344/ 348/ 350/ 352, 356/ 358/ 360/ 364/ 366/ 368, 372/ 374/ 376/ 380/ 382/ 384, 388/ 390/ 392/ 396/ 398/ 400, 404/ 406/ 408/ 412/ 414/ 416, 420/ 422/ 424/ 428/ 430/ 432, 436/ 438/ 440/ 444/ 446/ 448, 452/ 454/ 456/ 524/ 526/ 528, 460/ 462/ 464/ 524/ 526/ 528, 468/ 470/ 472/ 524/ 526/ 528, 476/ 478/ 480/ 524/ 526/ 528, 484/ 486/ 488/ 524/ 526/ 528, 492/ 494/ 496/ 524/ 526/ 528, 500/ 502/ 504/ 532/ 534/ 536, 508/ 510/ 512/ 532/ 534/ 536, 516/ 518/ 520/ 532/ 534/ 536, 540/ 542/ 544/ 548/ 550/ 552, e 556/ 558/ 560/ 564/ 566/ 568.

19. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-LAG3 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três HCDRs em uma HCVR da SEQ ID NO: 418; e três LCDRs em uma LCVR da SEQ ID NO: 426.

20. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a terapia antitumoral é um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo selecionados a partir do grupo consistindo em REGN2810, nivolumab e pembrolizumab.

21. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a terapia antitumoral é um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo selecionados a partir do grupo

consistindo em atezolizumab, avelumab e durvalumab.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-LAG3 é administrado em combinação com uma segunda terapia antitumoral.

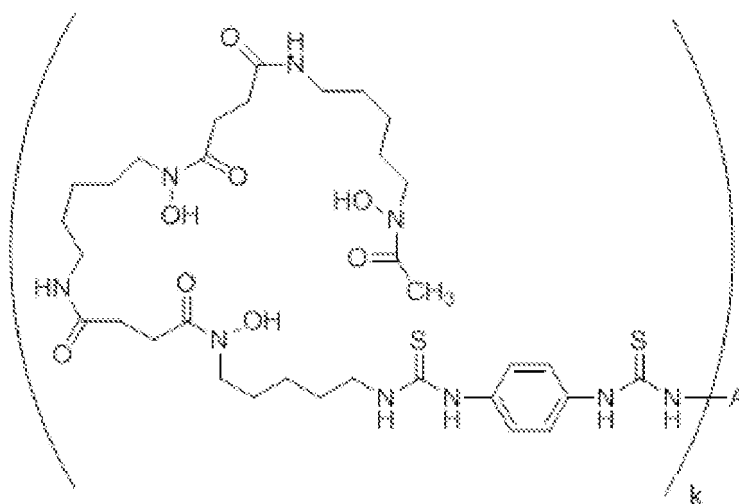
23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia antitumoral é selecionada a partir do grupo consistindo em um inibidor do eixo de sinalização PD-1/PD-L1, um inibidor de CTLA-4, um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, um inibidor de GITR, um antagonista de um outro coinibidor ou ligante de célula T, um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um inibidor de Ang2, um inibidor do fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ ), um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um inibidor de CD20, um anticorpo para um antígeno específico de tumor, uma vacina contra o câncer, um anticorpo biespecífico, uma citotoxina, um agente quimioterapêutico, ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R, um inibidor de IL-4R, um inibidor de IL-10, IL-2, IL-7, IL-21, IL-15, e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC).

24. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia antitumoral é selecionada a partir do grupo consistindo em um anticorpo anti-LAG3, REGN2810, BGB-A317, nivolumab, pidilizumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MDX-1105, REGN3504, ipilimumab, um anticorpo anti-CD-28, um anticorpo anti-2B4, um anticorpo anti-LY108, um anticorpo anti-LAIR1, um anticorpo anti-ICOS, um anticorpo anti-CD160, um anticorpo anti-VISTA, aflibercept, bevacizumab, ranibizumab, sunitinib, sorafenib, pazopanib, nesvacumab, erlotinib, cetuximab, rituximab, um anticorpo anti-CA9, um anticorpo anti-CA125, um anticorpo anti-antígeno 3 associado a melanoma (MAGE3), um anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário (CEA),

um anticorpo anti-vimentina, um anticorpo anti-tumor-M2-PK, um anticorpo anti-antígeno específico da próstata (PSA), um anticorpo anti-mucina-1, um anticorpo anti-MART-1, um anticorpo anti-CA19-9, Bacilo Calmette-Guerin, um anticorpo biespecífico CD3xCD20, um anticorpo biespecífico PSMAxCD3, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatina, carboplatina, gencitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel, vincristina, ciclofosfamida, radioterapia, sarilumab, dupilumab, ADC anti-CD19-DM4, e ADC anti-DS6-DM4.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 24, caracterizado pelo fato de que o tumor é selecionado a partir do grupo consistindo em câncer hematológico, câncer cerebral, câncer de célula renal, câncer ovariano, câncer vesical, câncer prostático, câncer mamário, carcinoma de célula hepática, câncer ósseo, câncer colônico, câncer pulmonar de célula não pequena, carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço, câncer colorretal, mesotelioma, linfoma de célula B, e melanoma.

26. Composto, caracterizado pelo fato de ser da fórmula (III):



em que A é um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que liga LAG3 e k é de 1 a 30.

27. Composto de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo

tem uma ou mais propriedades selecionadas a partir do grupo consistindo em:

(a) liga LAG3 monomérico humano com uma constante de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) de menos do que cerca de 8 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37°C;

(b) liga LAG3 monomérico humano com um  $K_D$  menor do que cerca de 10 nM em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25°C;

(c) liga LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  de menos do que cerca de 1 nM como medido em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 37°C; e

(d) liga LAG3 humano dimérico com um  $K_D$  menor do que cerca de 1,1 nM em um ensaio de ressonância plasmônica superficial a 25°C.

28. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 ou 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDRs) em uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a HCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538, e 554; e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDRs) em uma região variável de cadeia leve (LCVR), em que a LCVR tem uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546, e 562.

29. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDRs) e três regiões determinantes

de complementaridade de cadeia leve (LCDRs) dentro do par de sequências da região variável de cadeia pesada (HCVR)/região variável de cadeia leve (LCVR) selecionado a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546, e 554/562.

30. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três HCDRs e três LCDRs selecionadas a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4/ 6/ 8/ 12/ 14/ 16, 20/ 22/ 24/ 28/ 30/ 32, 36/ 38/ 40/ 44/ 46/ 48, 52/ 54/ 56/ 60/ 62/ 64, 68/ 70/ 72/ 76/ 78/ 80, 84/ 86/ 88/ 92/ 94/ 96, 100/ 102/ 104/ 108/ 110/ 112, 116/ 118/ 120/ 124/ 126/ 128, 132/ 134/ 136/ 140/ 142/ 144, 148/ 150/ 152/ 156/ 158/ 160, 164/ 166/ 168/ 172/ 174/ 176, 180/ 182/ 184/ 188/ 190/ 192, 196/ 198/ 200/ 204/ 206/ 208, 212/ 214/ 216/ 220/ 222/ 224, 228/ 230/ 232/ 236/ 238/ 240, 244/ 246/ 248/ 252/ 254/ 256, 260/ 262/ 264/ 268/ 270/ 272, 276/ 278/ 280/ 284/ 286/ 288, 292/ 294/ 296/ 300/ 302/ 304, 308/ 310/ 312/ 316/ 318/ 320, 324/ 326/ 328/ 332/ 334/ 336, 340/ 342/ 344/ 348/ 350/ 352, 356/ 358/ 360/ 364/ 366/ 368, 372/ 374/ 376/ 380/ 382/ 384, 388/ 390/ 392/ 396/ 398/ 400, 404/ 406/ 408/ 412/ 414/ 416, 420/ 422/ 424/ 428/ 430/ 432, 436/ 438/ 440/ 444/ 446/ 448, 452/ 454/ 456/ 524/ 526/ 528, 460/ 462/ 464/ 524/ 526/ 528, 468/ 470/ 472/ 524/ 526/ 528, 476/ 478/ 480/ 524/ 526/ 528, 484/ 486/ 488/ 524/ 526/ 528, 492/ 494/ 496/ 524/ 526/ 528, 500/ 502/ 504/ 532/ 534/ 536, 508/ 510/ 512/ 532/ 534/ 536, 516/ 518/ 520/ 532/ 534/ 536, 540/ 542/ 544/ 548/ 550/ 552, e 556/ 558/ 560/ 564/ 566/ 568.

31. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a

antígeno do mesmo compreende três HCDRs em uma HCVR da SEQ ID NO: 418; e três LCDRs em uma LCVR da SEQ ID NO: 426.

32. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada (HCDR)-1 compreendendo a SEQ ID NO: 420; uma HCDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 422; e uma HCDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 424; uma região determinante de complementaridade de cadeia leve (LCDR)-1 compreendendo a SEQ ID NO: 428; uma LCDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 430; e uma LCDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 432.

33. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 32, caracterizado pelo fato de que  $k$  é menor do que ou igual a 2.

34. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 32, caracterizado pelo fato de que  $k$  é 1 ou 2.

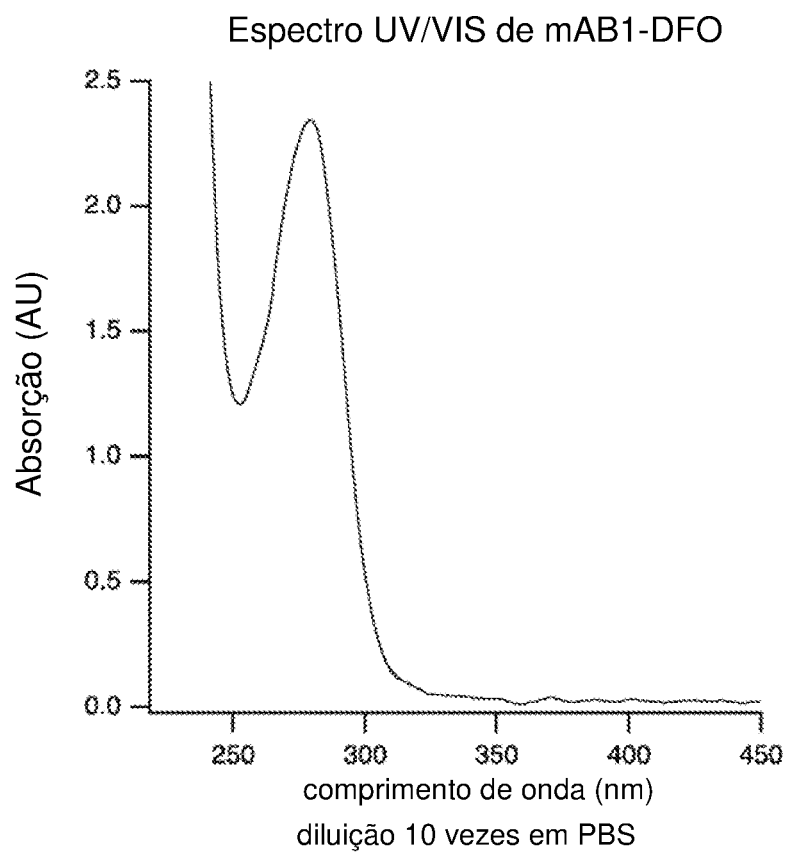


FIGURA 1



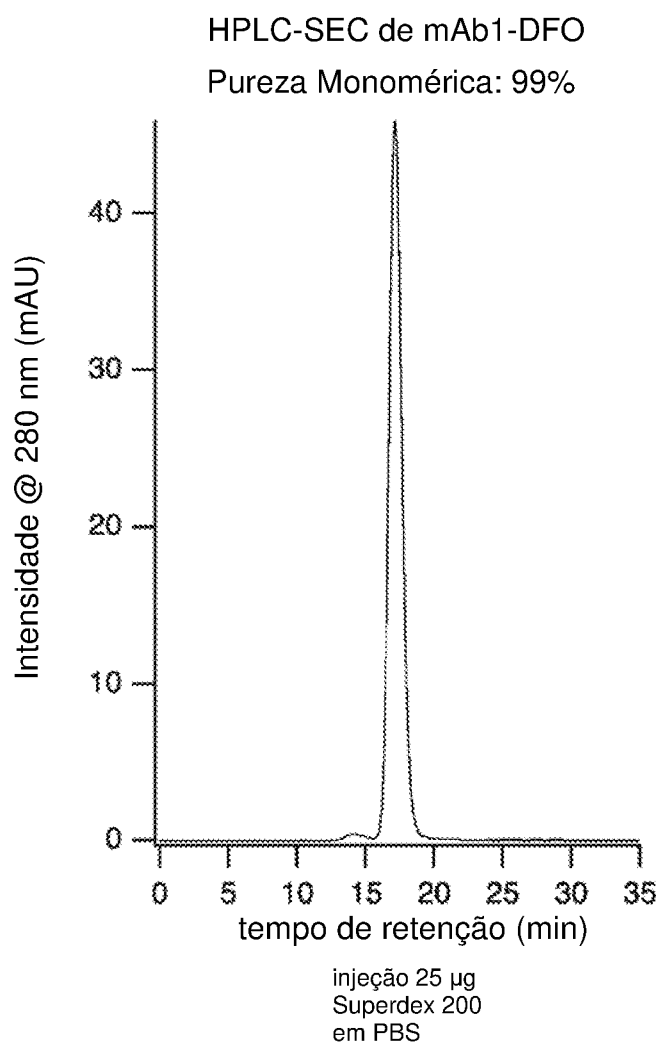


FIGURA 2

radio-SEC: Isótipo-DFO-<sup>89</sup>Zr

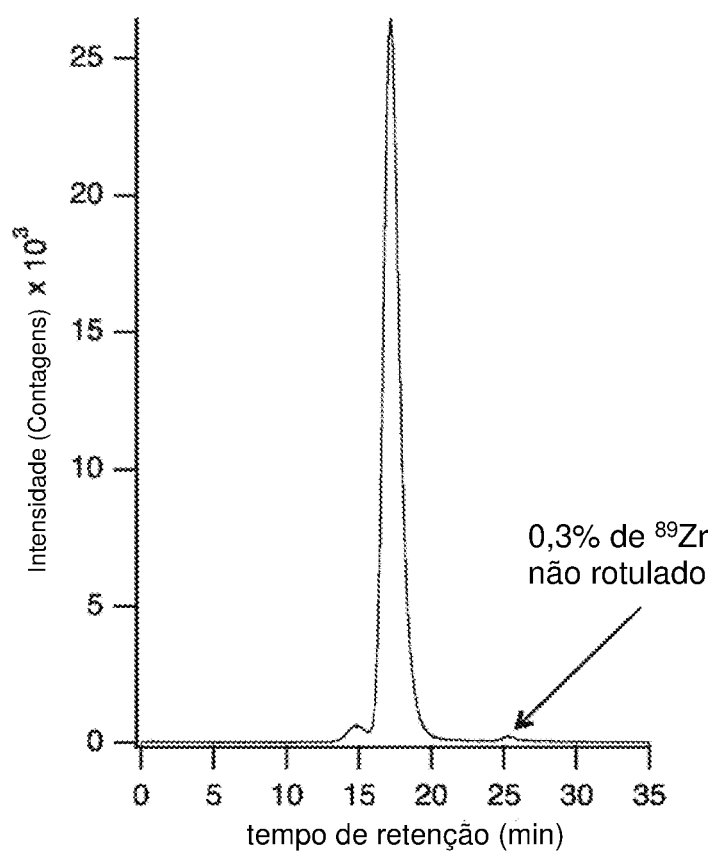


FIGURA 3

radio-SEC: Isótipo-DFO- $^{89}\text{Zr}$

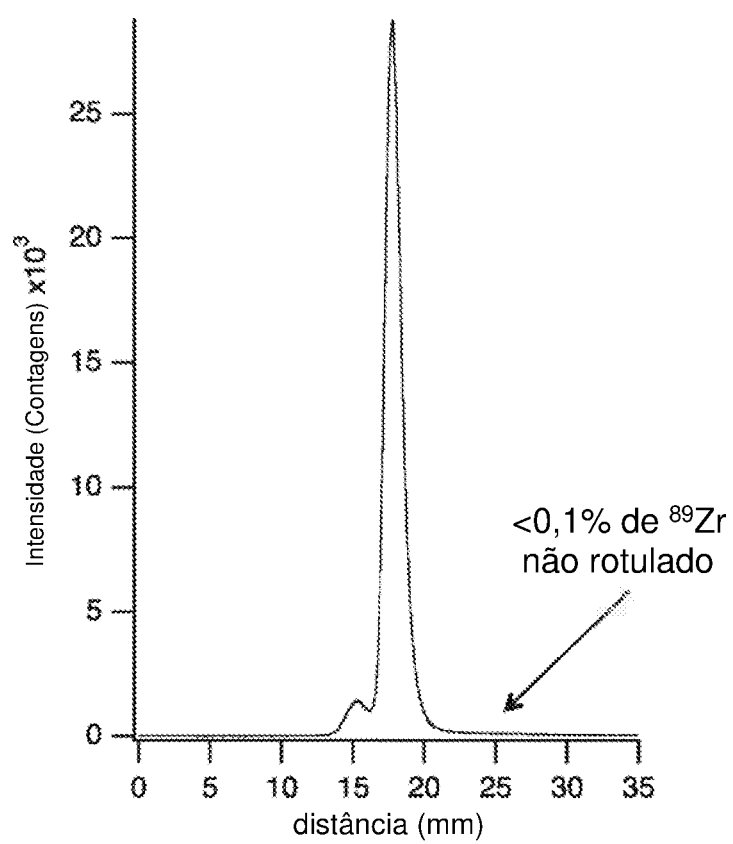


FIGURA 4

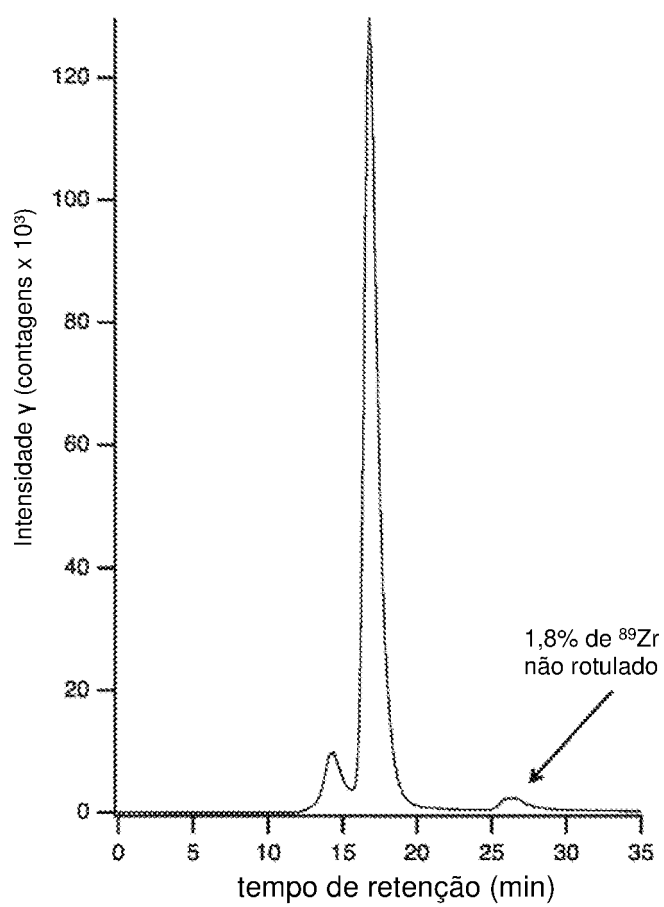
radio-SEC: mAb1-DFO-<sup>89</sup>Zr

FIGURA 5

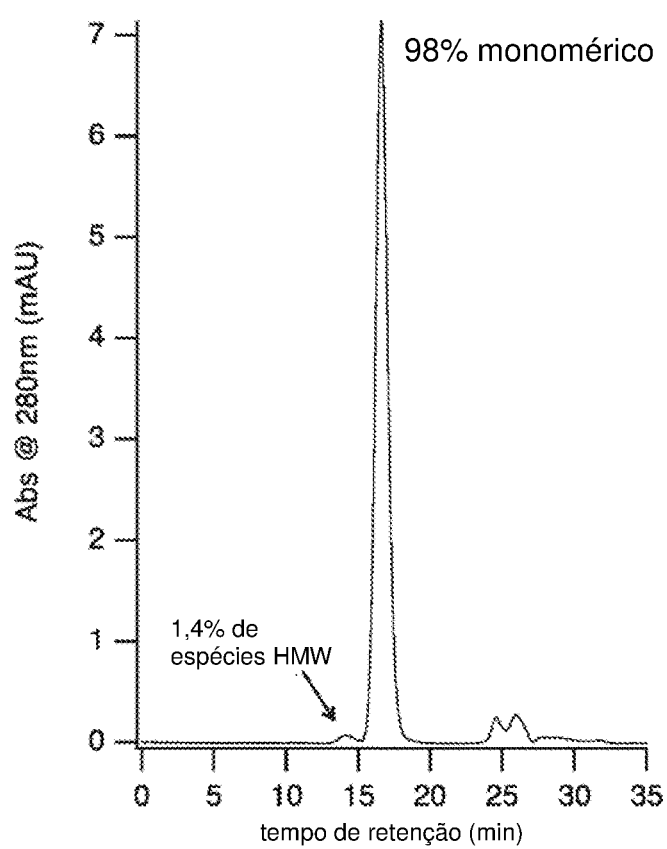
UV-SEC: Isótipo-DFO-<sup>89</sup>Zr

FIGURA 6

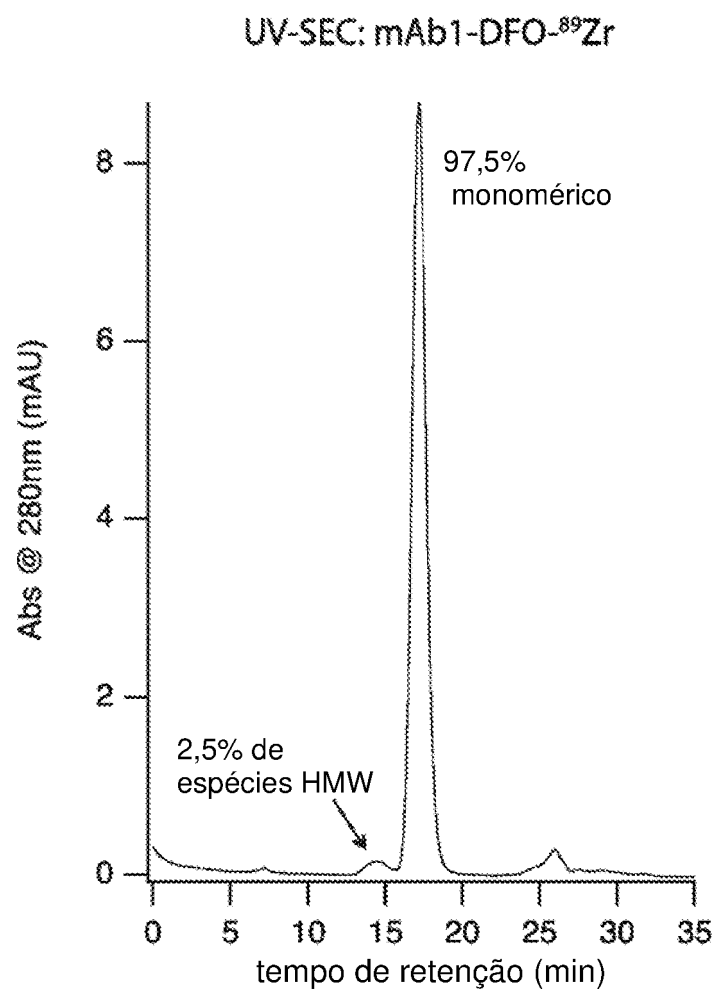


FIGURA 7

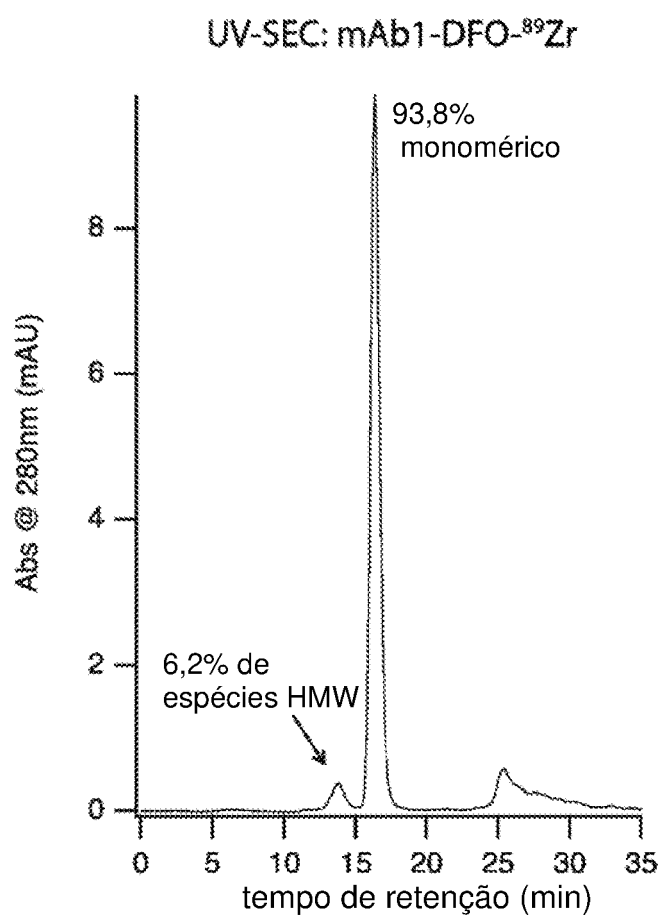


FIGURA 8

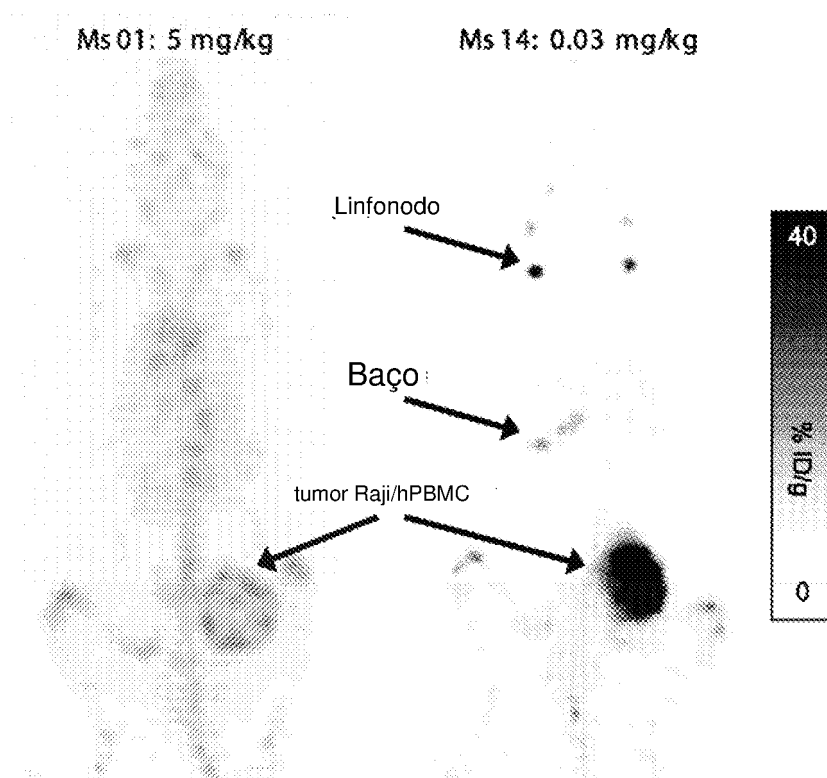


FIGURA 9



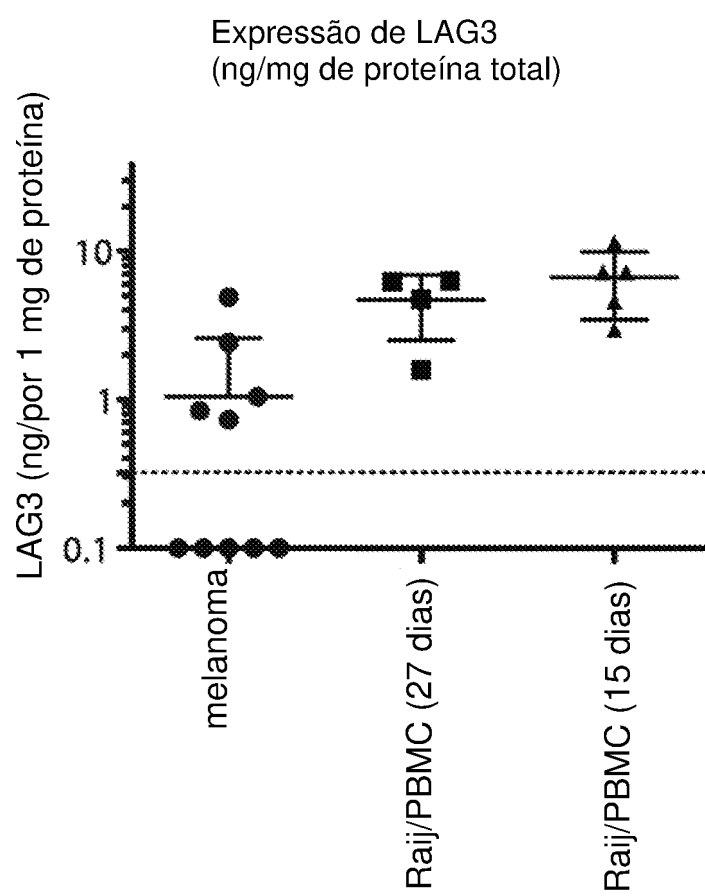
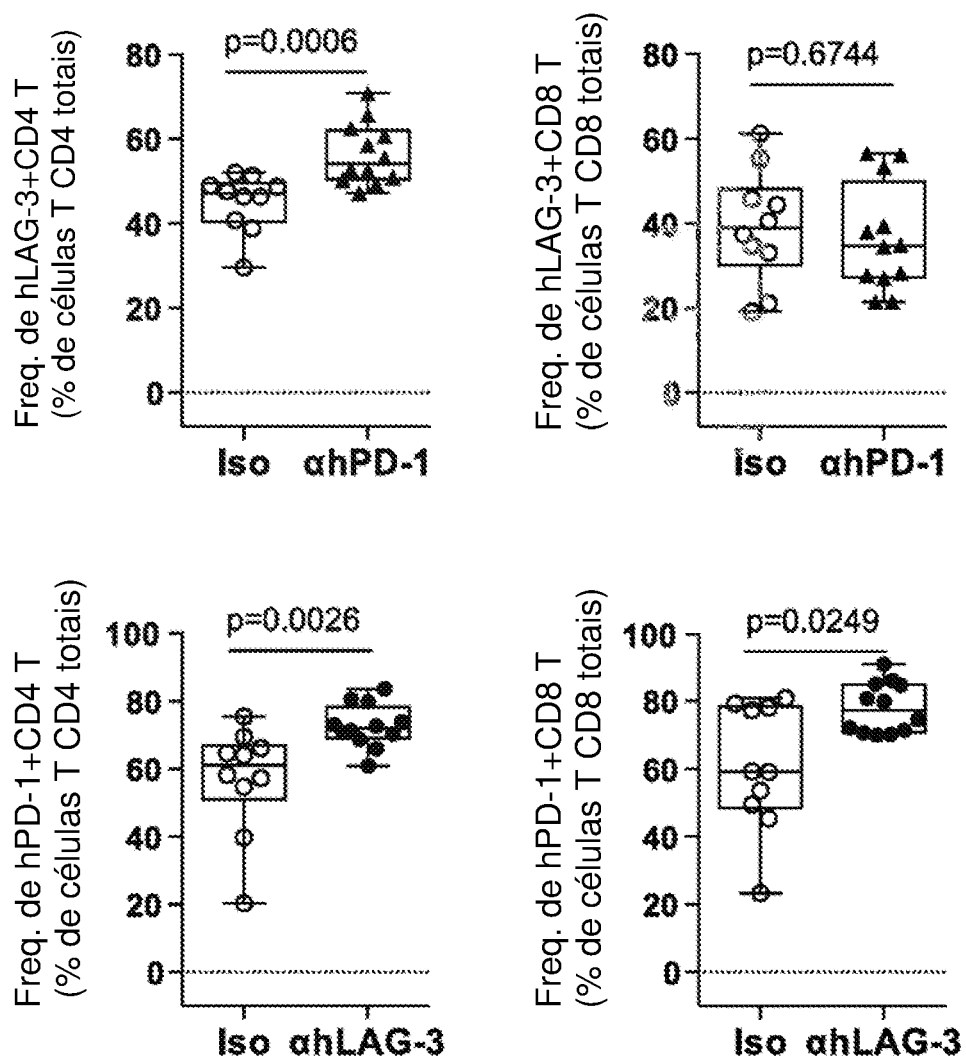


FIGURA 10



A análise estatística foi realizada usando o teste T não paramétrico de Mann-Whitney não emparelhado

FIGURA 11

Informação de amostra de tecidos de melanoma

ID da amostra	Sexo	Idade	Etnicidade	Tipos de amostra	Matriz	Diagnóstico	Diagnóstico histológico	TMM	Estágio	Nível e Clark de invasão	microstadiamento de Breslow	Tamanho do tumor, cm	Metástase	Data da cirurgia	Conteúdo do tumor %	Peso, g
13181512(3)	M	45	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula hepteloide	T4bN3M0	IIIc	V	1	1.8x1x1	9/9 linfonodos	03/16/2015	95	0.9
13171912(3)	M	58	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula de fuso	T4bN3M0	IIIc	V	1	6x5x1	nenhum	09/23/2014	100	0.8
13841112(1)	F	51	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula msa	T4a-N2M0	IIIB	IV	1.3	3.5x2.5x1.3	nenhum	03/08/2010	100	0.8
13788112(4)	F	63	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula de fuso	T4bN3M0	IIIc	III	2.5	7 cm	1/1 linfonodos	10/23/2009	100	0.7
13765112(2)	M	56	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula hepteloide	T4bN3M0	IIIc	III	0.7	2.5x1.5	6/6 linfonodos	08/26/2009	90	0.8
13177912(5)	M	58	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula hepteloide	T4bN3M0	IIIc	V	30 mm	5x3x3	11/17 linfonodos	12/13/2014	100	0.7
13129112(1)	F	33	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula nervoide	T4bN3M0	IIIc	III	15 mm	3x1.5	6/6 linfonodos	03/15/2012	100	1
13108616(1)	M	59	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula hepteloide	T4a-N3M0	IIIB	V	10 mm	2.5 cm	nenhum	05/12/2011	75	0.6
13547112(1)	M	73	Caucasiano	FF	pele e tecido adiposo	melanoma	melanoma de célula hepteloide	recorrente	recorrente	III	15 mm	N/A	1/18 linfonodos	05/21/2008	100	0.9
13524112(7)	F	44	Caucasiano	FF	pele	melanoma	melanoma de célula hepteloide	T4bN2aM0	IIIc	III	22 mm	2 cm	2/12 linfonodos	01/24/2008	100	0.65

FIGURA 12

RESUMO

CONJUGADO DE ANTICORPO RADIORROTULADO, MÉTODO PARA IMAGEAMENTO DE UM TECIDO QUE EXPRESSA LAG3 E PARA TRATAR UM TUMOR, E, COMPOSTO

Anticorpos anti-LAG3 radiorrotulados e seu uso no imageamento de imuno-PET são aqui providos. São incluídos métodos para detectar a presença de proteínas LAG3 em um paciente ou amostra.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

#### Campo 1



#### Campo 2



#### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 139123e002.txt
- Data de Geração do Código: 23/09/2019
- Hora de Geração do Código: 09:39:58
- Código de Controle:
  - Campo 1: 29AD9E84F8D7445D
  - Campo 2: 3E9A192E252C68E4