

IC PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

11-12595

Q.F

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO Anticuerpos Humanos que se unen al gen 3
de activación linfocitaria (LAG-3) y los usos de estos

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE MEDAREX, INC.

DOMICILIO Princeton, New Jersey, Estados Unidos

74. APODERADO Alvaro Correa Ordoñez

22. BOGOTÁ, D.C., Febrero 03, 2011

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-012595- -00000-0000

Fecha: 2011-02-03 16:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 437

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MEDAREX, INC.

Dirección: Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540
Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒ X

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 Usaquén

TP 20281

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: THUDIUM, Kent, B.; KORMAN, Alan, J.; LEBLANC, Heidi; YAMANAKA, Mark; SELBY, Mark;
ZENS, Kyra, D.

Dirección: 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035, US;

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/053405

Fecha 11.08.2009

Publicación Internacional No. WO2010/019570

Fecha 18.02.2010

⑥

Título (54) ANTICUERPOS HUMANOS QUE SE UNEN AL GEN 3 DE ACTIVACION LINFOCITARIA (LAG-3) Y LOS USOS DE ESTOS

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI

☒ X

NO

☐

US

11-08-2008

61/188,548

⑨

Comprobante de pago No.

11-003559 - 10-112,679 - 10-112,680 - 11-003546 - 11-003615

Fecha 29-12-2010 - 13-01-2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos
listado de Secuencias

11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 70.143.366 de Ucaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

2011/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 003559

Bogotá D.C., 13 de 2011 - 17:00:38

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353200315	12/01/2011	148.414.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-012595- -00000-0000

Fecha: 2011-02-03 16:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 437

3
2011/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 003615

Bogotá D.C., 13 de 2011 - 17:00:38

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353200315	12/01/2011	148.414.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	819.000.00	819.000.00
				\$819.000.00

SON: **OCHOCIENTOS DIECINUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-012595- -00000-0000

Fecha: 2011-02-03 16:22:56

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 437

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 13 de 2011 - 17:01:29

2010/026

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800174089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 112,679
FECHA : DICIEMBRE 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-012595-00000-0000

Fecha: 2011-02-03 16:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 437

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	400601993	29/12/2010	3,715,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	50,000.00
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50,000.00
		TOTAL :	50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CASH APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2010/026

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 112,680
FECHA : DICIEMBRE 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-012595-00000-0000

Fecha: 2011-02-03 16:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 437

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE.	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	400601993	29/12/2010	5,715,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	50,000.00
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50,000.00
		TOTAL :	50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

6
2011/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 003546

Bogotá D.C., 13 de 2011 - 17:00:38

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353200315	12/01/2011	148.414.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD DE INVERSION	485.000.00	485.000.00
			\$485.000.00

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-012595- -00000-0000

Fecha: 2011-02-03 16:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 437

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 13 de 2011 - 17:01:26



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/395

(71) Solicitante(s): **MEDAREX, INC.**

(72) Inventor(es): THUDIUM, Kent, B.; KORMAN, Alan, J.; LEBLANC, Heidi; YAMANAKA, Mark; SELBY, Mark; ZENS, Kyra, D.

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32)

Fecha

(33)

País

61/188,548

11-08-2008

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 11-03-2011

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 18.02.2010

Fecha de presentación de la solicitud: 11.08.2009

N° publicación: WO2010/019570

No. de solicitud: PCT/US2009/053405

(54) Título: ANTICUERPOS HUMANOS QUE SE UNEN AL GEN 3 DE ACTIVACION LINFOCITARIA (LAG-3) Y LOS USOS DE ESTOS



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: _____		(22) Fecha de solicitud: _____		
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/395				
(71) Solicitante(s) MEDAREX, INC.				
(72) Inventor(es): THUDIUM, Kent, B.; KORMAN, Alan, J.; LEBLANC, Heidi; YAMANAKA, Mark; SELBY, Mark; ZENS, Kyra, D.				
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ				
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	
	61/188,548	11-08-2008	US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-03-2011		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 18.02.2010		
Fecha de presentación de la solicitud: 11.08.2009		No. Publicación: WO2010/019570		
No. de solicitud: PCT/US2009/053405				
(54) Título: ANTICUERPOS HUMANOS QUE SE UNEN AL GEN 3 DE ACTIVACION LINFOCITARIA (LAG-3) Y LOS USOS DE ESTOS				
(57) Resumen: La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a la LAG-3 con alta afinidad, particularmente anticuerpos monoclonales humanos. Preferentemente, los anticuerpos se unen a la LAG-3 humana. En ciertas modalidades, los anticuerpos se unen tanto a la LAG-3 humana como a la LAG-3 de mono pero no se unen a la LAG-3 de ratón. La invención proporciona anticuerpos anti-LAG-3 que pueden inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del MHC de clase II y eso puede estimular respuestas de				
CONTINUA AL RESPALDO ...				

linfocito T específicas para un antígeno. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, vectores de expresión, células huésped y métodos para expresar los anticuerpos de la invención. Se proporcionan también inmunoconjugados, moléculas biespecíficas y composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de esta invención. Esta divulgación también proporciona métodos para detectar la LAG-3, así como también métodos para tratar por estimulación respuestas inmunitarias utilizando un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención. También se proporciona la terapia combinada, en la que un anticuerpo anti-LAG-3 se administra junto con al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/395	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) MEDAREX, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. 61/188,548	32) Fecha 11-08-2008	(33) País US
		(72) Inventor(es) THUDIUM, Kent, B.; KORMAN, Alan, J.; LEBLANC, Heidi; YAMANAKA, Mark; SELBY, Mark; ZENS, Kyra, D.	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-03-2011		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 18.02.2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 11.08.2009		N° publicación: WO2010/019570	
No. de solicitud PCT/US2009/053405			
(54) Título: ANTICUERPOS HUMANOS QUE SE UNEN AL GEN 3 DE ACTIVACION LINFOCITARIA (LAG-3) Y LOS USOS DE ESTOS			

Reivindicación(es): 1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo se une a la LAG-3 humana y presenta al menos una de las siguientes propiedades:

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

ADVANCE E-MAIL
CORRECTED VERSION
PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

REMILLARD, Jane, E.
LAHIVE & COCKFIELD, LLP
One Post Office Square
Boston, MA 02109-2127
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 16 April 2010 (16.04.2010)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference MXI-392PC	
International application No. PCT/US2009/053405	International filing date (day/month/year) 11 August 2009 (11.08.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address MEDAREX, INC. 707 State Road Princeton, NJ 08540 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address MEDAREX, INC. Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Durand Evelyne e-mail PT01.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 01
Facsimile No. +41 22 338 82 70	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 February 2010 (18.02.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/019570 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(74) Agents: REMILLARD, Jane, E. et al.; LAHIVE & COCKFIELD, LLP, One Post Office Square, Boston, MA 02109-2127 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2009/053405

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
11 August 2009 (11.08.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/188,548 11 August 2008 (11.08.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
MEDAREX, INC. [US/US]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): THUDIUM, Kent, B. [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). KORMAN, Alan, J. [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). LEBLANC, Heidi [CA/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). YAMANAKA, Mark [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). SELBY, Mark [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). ZENS, Kyra, D. [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2010/019570 A2

(54) Title: HUMAN ANTIBODIES THAT BIND LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE-3 (LAG-3), AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies that specifically bind to LAG-3 with high affinity, particularly human monoclonal antibodies. Preferably, the antibodies bind human LAG-3. In certain embodiments, the antibodies bind both human and monkey LAG-3 but do not bind mouse LAG-3. The invention provides anti-LAG-3 antibodies that can inhibit the binding of LAG-3 to MHC Class II molecules and that can stimulate antigen-specific T cell responses. Nucleic acid molecules encoding the antibodies of the invention, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies of the invention are also provided. Immunoconjugates, bispecific molecules and pharmaceutical compositions comprising the antibodies of the invention are also provided. This disclosure also provides methods for detecting LAG-3, as well as methods for treating stimulating immune responses using an anti-LAG-3 antibody of the invention. Combination therapy, in which an anti-LAG-3 antibody is co-administered with at least one additional immuno stimulatory antibody, is also provided.

**HUMAN ANTIBODIES THAT BIND LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE-3
(LAG-3), AND USES THEREOF**

Background of the Invention

5 Lymphocyte Activation Gene-3, or LAG-3 (also know as CD223), is a member
of the immunoglobulin supergene family and is structurally and genetically related to
CD4. LAG-3 is not expressed on resting peripheral blood lymphocytes but is expressed
on activated T cells and NK cells. LAG-3 is a membrane protein encoded by a gene
located on the distal part of the short arm of chromosome 12, near the CD4 gene,
10 suggesting that the LAG-3 gene may have evolved through gene duplication (Triebel *et al.* (1990) *J. Exp. Med.* 171:1393-1405).

 Similar to CD4, LAG-3 has been demonstrated to interact with MHC Class II
molecules but, unlike CD4, LAG-3 does not interact with the human immunodeficiency
virus gp120 protein (Baixeras *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:327-337). Studies using a
15 soluble LAG-3 immunoglobulin fusion protein (sLAG-3Ig) demonstrated direct and
specific binding of LAG-3 to MHC class II on the cell surface (Huard *et al.* (1996) *Eur.*
J. Immunol. 26:1180-1186).

 In *in vitro* studies of antigen-specific T cell responses, the addition of anti-LAG-
3 antibodies led to increased T cell proliferation, higher expression of activation antigens
20 such as CD25, and higher concentrations of cytokines such as interferon-gamma and
interleukin-4, supporting a role for the LAG-/MHC class II interaction in down-
regulating antigen-dependent stimulation of CD4⁺ T lymphocytes (Huard *et al.* (1994)
Eur. J. Immunol. 24:3216-3221). The intra-cytoplasmic region of LAG-3 has been
demonstrated to interact with a protein termed LAP, which is thought to be a signal
25 transduction molecule involved in the downregulation of the CD3/TCR activation
pathway (Iouzalet *et al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:2885-2891). Furthermore,
CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (T_{reg}) have been shown to express LAG-3 upon
activation and antibodies to LAG-3 inhibit suppression by induced T_{reg} cells, both *in*
vitro and *in vivo*, suggesting that LAG-3 contributes to the suppressor activity of T_{reg}
30 cells (Huang, C. *et al.* (2004) *Immunity* 21:503-513). Still further, LAG-3 has been
shown to negatively regulate T cell homeostasis by regulatory T cells in both T cell-
dependent and independent mechanisms (Workman, C.J. and Vignali, D.A. (2005) *J.*
Immunol. 174:688-695).

In certain circumstances, LAG-3 also has been shown to have immunostimulatory effects. For example, LAG-3 transfected tumor cells transplanted into syngeneic mice showed marked growth reduction or complete regression as compared to untransfected tumor cells, suggesting that LAG-3 expression on the tumor cells stimulated an anti-tumor response by triggering antigen presenting cells via MHC class II molecules (Prigent *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:3867-3876). Additionally, soluble LAG-3 Ig fusion protein has been shown to stimulate both humoral and cellular immune responses when administered to mice together with an antigen, indicating that soluble LAG-3Ig can function as a vaccine adjuvant (El Mir and Triebel (2000) *J. Immunol.* 164:5583-5589). Furthermore, soluble human LAG-3Ig has been shown to amplify the *in vitro* generation of type I tumor-specific immunity (Casati *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:4450-4460). The functional activity of LAG-3 is reviewed further in Triebel (2003) *Trends Immunol.* 24:619-622. In view of the above, additional agents for modulating the activity of LAG-3 are of interest.

15

Summary

The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies, in particular human monoclonal antibodies, that specifically bind LAG-3 and that have desirable functional properties. These properties include high affinity binding to human LAG-3, binding to human and monkey LAG-3 (*e.g.*, cynomolgus and/or rhesus monkey LAG-3) but not to mouse LAG-3, the ability to inhibit binding of LAG-3 to major histocompatibility (MHC) Class II molecules and/or the ability to stimulate antigen-specific T cell responses. The antibodies of the invention can be used, for example, to detect LAG-3 protein or to stimulate antigen-specific T cell responses, such as in a tumor-bearing subject or a virus-bearing subject.

25

In one aspect, the invention pertains to an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human LAG-3 and exhibits at least one of the following properties:

- (a) binds monkey LAG-3;
- (b) does not bind mouse LAG-3;
- (c) inhibits binding of LAG-3 to major histocompatibility (MHC) class II molecules;
- and
- (d) stimulates an immune response.

30

Preferably, the antibody exhibits at least two of properties (a), (b), (c) and (d). More preferably, the antibody exhibits at least three of properties (a), (b), (c) and (d). Even more preferably, the antibody exhibits all four of properties (a), (b), (c) and (d).

In a preferred embodiment, the antibody stimulates an antigen-specific T cell response, such as interleukin-2 (IL-2) production in an antigen-specific T cell response. In other embodiments, the antibody stimulates an immune response such as an anti-tumor response (*e.g.*, inhibits tumor growth in an *in vivo* tumor graft model) or an autoimmune response (*e.g.*, promotes the development of diabetes in NOD mice). In another preferred embodiment, the antibody binds an epitope of human LAG-3 comprising the amino acid sequence PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76). In yet another preferred embodiment, the antibody binds an epitope of human LAG-3 comprising the amino acid sequence HPAPPSSW (SEQ ID NO: 77) or PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). In still other embodiments, the antibody binds to human LAG-3 with a K_D of 1×10^{-7} M or less, or binds to human LAG-3 with a K_D of 1×10^{-8} M or less, or binds to human LAG-3 with a K_D of 5×10^{-9} M or less, or binds to human LAG-3 with a K_D of 1×10^{-9} M or less. In one embodiment, the antibody stains pituitary tissue by immunohistochemistry, whereas in another embodiment, the antibody does not stain pituitary tissue by immunohistochemistry.

In another aspect, the invention pertains to an isolated human monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, wherein the antibody cross-competes for binding to human LAG-3 with a reference antibody, wherein the reference antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43;

(b) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44;

(c) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45;

(d) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46;

(e) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47; or

(f) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

10 In a preferred embodiment, the reference antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43. In another preferred embodiment, the reference antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44. In another preferred embodiment, the reference antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45. In another preferred embodiment, the reference antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46. In another preferred embodiment, the reference antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47. In another preferred embodiment, the reference antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

25 In another aspect, the invention pertains to an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-20 gene, a human V_H 4-34 gene, a human V_H 3-33 gene or a human V_H 1-24 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In another aspect, the invention pertains to an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L18 gene, a human V_K L6 gene or a human V_K

A27 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In a preferred embodiment, the invention provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising:

- (a) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-34 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene;
- (b) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-33 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K A27 gene;
- (c) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-20 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L18 gene;
- (d) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 1-24 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene; or
- (e) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-33 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene;

wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

In another aspect, the invention pertains to an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising:

- (a) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-42;
- (b) a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 43-48;

wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

A preferred combination comprises:

- (a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37; and
- (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43.

Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44.

5 Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45.

10 Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46.

15 Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47.

20 Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

25 The antibodies of the invention can be, for example, full-length antibodies, for example of an IgG1, IgG2 or IgG4 isotype. In a preferred embodiment, the antibody is an IgG4 isotype. In another preferred embodiment, the antibody is an IgG4 isotype having a serine to proline mutation in the heavy chain constant region hinge region (at a position corresponding to position 241 as described in Angal *et al.* (1993) *Mol.*
30 *Immunol.* 30:105-108), such that inter-heavy chain disulfide bridge heterogeneity is reduced or abolished. Alternatively, the antibodies can be antibody fragments, such as Fab, Fab' or Fab'2 fragments, or single chain antibodies.

This disclosure also provides an immunoconjugate comprising an antibody of the invention, or antigen-binding portion thereof, linked to a therapeutic agent, *e.g.*, a cytotoxin or a radioactive isotope. This disclosure also provides a bispecific molecule comprising an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention, linked to a
5 second functional moiety having a different binding specificity than said antibody, or antigen binding portion thereof.

Compositions comprising an antibody, or antigen-binding portion thereof, or immunoconjugate or bispecific molecule of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier are also provided.

10 Nucleic acid molecules encoding the antibodies, or antigen-binding portions thereof, of the invention are also encompassed by this disclosure, as well as expression vectors comprising such nucleic acids and host cells comprising such expression vectors. Methods for preparing anti-LAG-3 antibodies using the host cells comprising such expression vectors are also provided and can include the steps of (i) expressing the
15 antibody in the host cell and (ii) isolating the antibody from the host cell.

In another aspect, the invention pertains to methods of stimulating immune responses using the anti-LAG-3 antibodies of the invention. For example, in one embodiment, the invention provides a method of stimulating an antigen-specific T cell response comprising contacting said T cell with an antibody of the invention such that
20 an antigen-specific T cell response is stimulated. In a preferred embodiment, interleukin-2 production by the antigen-specific T cell is stimulated. In another embodiment, the invention provides a method of stimulating an immune response (*e.g.*, an antigen-specific T cell response) in a subject comprising administering an antibody of the invention to the subject such that an immune response (*e.g.*, an antigen-specific T
25 cell response) in the subject is stimulated. In a preferred embodiment, the subject is a tumor-bearing subject and an immune response against the tumor is stimulated. In another preferred embodiment, the subject is a virus-bearing subject and an immune response against the virus is stimulated.

In yet another aspect, the invention provides a method for inhibiting growth of
30 tumor cells in a subject comprising administering to the subject an antibody of the invention such that growth of the tumor is inhibited in the subject. In still another aspect, the invention provides a method for treating viral infection in a subject

comprising administering to the subject an antibody of the invention such that the viral infection is treated in the subject.

In yet another aspect, the invention provides a method for stimulating an immune response in a subject comprising administering to the subject an anti-LAG-3 antibody
 5 and at least one additional immunostimulatory antibody, such as an anti-PD-1 antibody, an anti-PD-L1 antibody and/or an anti-CTLA-4 antibody, such that an immune response is stimulated in the subject, for example to inhibit tumor growth or to stimulate an anti-viral response. In one embodiment, the subject is administered an anti-LAG-3 antibody and an anti-PD-1 antibody. In another embodiment, the subject is administered an anti-
 10 LAG-3 antibody and an anti-PD-L1 antibody. In yet another embodiment, the subject is administered an anti-LAG-3 antibody and an anti-CTLA-4 antibody. In one embodiment, the anti-LAG-3 antibody is a human antibody, such as an antibody of the disclosure. Alternatively, the anti-LAG-3 antibody can be, for example, a chimeric or humanized antibody. In another embodiment, the at least one additional
 15 immunostimulatory antibody (*e.g.*, anti-PD-1, anti-PD-L1 and/or anti-CTLA-4 antibody) is a human antibody. Alternatively, the at least one additional immunostimulatory antibody can be, for example, a chimeric or humanized antibody.

In yet another aspect, the invention pertains to a method for preparing an anti-LAG-3 antibody. The method comprises:

- 20 (a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-6, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7-12, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected
 25 from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-24, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25-30, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 31-36;
- (b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at
 30 least one altered antibody sequence; and
- (c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

Other features and advantages of the instant disclosure will be apparent from the following detailed description and examples, which should not be construed as limiting. The contents of all references, Genbank entries, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by
5 reference.

Brief Description of the Drawings

Figure 1A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 49) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 37) of the heavy chain variable region of the 25F7 human
10 monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 7) and CDR3 (SEQ ID NO: 13) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 1B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 55) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 43) of the kappa light chain variable region of the 25F7 human
15 monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 19), CDR2 (SEQ ID NO: 25) and CDR3 (SEQ ID NO: 31) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 2A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 50) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 38) of the heavy chain variable region of the 26H10 human
20 monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 8) and CDR3 (SEQ ID NO: 14) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 2B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 56) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 44) of the kappa light chain variable region of the 26H10 human
25 monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 20), CDR2 (SEQ ID NO: 26) and CDR3 (SEQ ID NO: 32) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 3A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 51) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 39) of the heavy chain variable region of the 25E3 human
30 monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 9) and CDR3 regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 3B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 57) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 45) of the kappa light chain variable region of the 25E3 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 27) and

CDR3 (SEQ ID NO: 33) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 4A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 52) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 40) of the heavy chain variable region of the 8B7 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 10) and CDR3 (SEQ ID NO: 16) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 4B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 58) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 46) of the kappa light chain variable region of the 8B7 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 28) and CDR3 (SEQ ID NO: 34) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 5A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 53) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 41) of the heavy chain variable region of the 11F2 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 11) and CDR3 (SEQ ID NO: 17) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 5B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 59) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 47) of the kappa light chain variable region of the 11F2 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) and CDR3 (SEQ ID NO: 35) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 6A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 54) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 42) of the heavy chain variable region of the 17E5 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 6), CDR2 (SEQ ID NO: 12) and CDR3 (SEQ ID NO: 18) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 6B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 60) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 48) of the kappa light chain variable region of the 17E5 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 30) and CDR3 (SEQ ID NO: 36) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 7 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable regions of 25F7 (SEQ ID NO: 37) with the human germline V_H 4-34 and JH5b amino acid sequences (SEQ ID NOS: 61 and 62, respectively).

5 Figure 8 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 25F7 (SEQ ID NO: 43) with the human germline V_k L6 and JK2 amino acid sequences (SEQ ID NOS: 63 and 64, respectively).

Figure 9 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable regions of 26H10 (SEQ ID NO: 38) with the human germline V_H 3-33 and JH6B amino acid sequences (SEQ ID NOS: 65 and 66, respectively).

10 Figure 10 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 26H10 (SEQ ID NO: 44) with the human germline V_k A27 and JK3 amino acid sequences (SEQ ID NOS: 67 and 68, respectively).

Figure 11 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable regions of 25E3 (SEQ ID NO: 39) with the human germline V_H 3-20 and JH4b amino acid sequences (SEQ ID NOS: 69 and 70, respectively).

Figure 12 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 25E3 (SEQ ID NO: 45) with the human germline V_k L18 and JK2 amino acid sequences (SEQ ID NOS: 71 and 72, respectively).

20 Figure 13 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable regions of 8B7 (SEQ ID NO: 40) with the human germline V_H 4-34 and JH5b amino acid sequences (SEQ ID NOS: 61 and 62, respectively).

Figure 14 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 8B7 (SEQ ID NO: 46) with the human germline V_k L6 and JK4 amino acid sequences (SEQ ID NOS: 63 and 72, respectively).

25 Figure 15 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable regions of 11F2 (SEQ ID NO: 41) with the human germline V_H 1-24 and JH4b amino acid sequences (SEQ ID NOS: 73 and 70, respectively).

Figure 16 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 11F2 (SEQ ID NO: 47) with the human germline V_k L6 and JK1 amino acid sequences (SEQ ID NOS: 63 and 74, respectively).

30 Figure 17 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable regions of 17E5 (SEQ ID NO: 42) with the human germline V_H 3-33 and 2-2 amino acid sequences (SEQ ID NOS: 65 and 70, respectively).

Figure 18 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 17E5 (SEQ ID NO: 48) with the human germline V_k L6 amino acid sequence (SEQ ID NOS: 63 and 75, respectively).

Figure 19 shows the alignment of the protein sequence encoded by the monkey LAG-3 cDNA clone pa23-5 (SEQ ID NO: 93) with the Genbank deposited rhesus monkey LAG-3 protein sequence (SEQ ID NO: 94) (Genbank Accession No. XM_001108923). The extra loop peptide region and transmembrane domain are underlined. The one amino acid difference between the two sequences (amino acid position 419) is highlighted in bold.

10

Detailed Description of the Invention

The present disclosure relates to isolated monoclonal antibodies, particularly human monoclonal antibodies, which bind to human LAG-3 and that have desirable functional properties. In certain embodiments, the antibodies of the invention are derived from particular heavy and light chain germline sequences and/or comprise particular structural features such as CDR regions comprising particular amino acid sequences. This disclosure provides isolated antibodies, methods of making such antibodies, immunoconjugates and bispecific molecules comprising such antibodies and pharmaceutical compositions containing the antibodies, immunoconjugates or bispecific molecules of the invention. This disclosure also relates to methods of using the antibodies, such as to detect LAG-3 protein, as well as to methods of using the anti-LAG-3 antibodies of the invention to stimulate immune responses, alone or in combination with other immunostimulatory antibodies. Accordingly, this disclosure also provides methods of using the anti-LAG-3 antibodies of the invention to, for example, inhibit tumor growth or treat viral infection.

In order that the present disclosure may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

The term "LAG-3" refers to Lymphocyte Activation Gene-3. The term "LAG-3" includes variants, isoforms, homologs, orthologs and paralogs. For example, antibodies specific for a human LAG-3 protein may, in certain cases, cross-react with a LAG-3 protein from a species other than human. In other embodiments, the antibodies specific for a human LAG-3 protein may be completely specific for the human LAG-3 protein and may not exhibit species or other types of cross-reactivity, or may cross-react with

LAG-3 from certain other species but not all other species (*e.g.*, cross-react with monkey LAG-3 but not mouse LAG-3). The term "human LAG-3" refers to human sequence LAG-3, such as the complete amino acid sequence of human LAG-3 having Genbank Accession No. NP_002277. The term "mouse LAG-3" refers to mouse sequence LAG-3, such as the complete amino acid sequence of mouse LAG-3 having Genbank Accession No. NP_032505. LAG-3 is also known in the art as, for example, CD223. The human LAG-3 sequence may differ from human LAG-3 of Genbank Accession No. NP_002277 by having, *e.g.*, conserved mutations or mutations in non-conserved regions and the LAG-3 has substantially the same biological function as the human LAG-3 of Genbank Accession No. NP_002277. For example, a biological function of human LAG-3 is having an epitope in the extracellular domain of LAG-3 that is specifically bound by an antibody of the instant disclosure or a biological function of human LAG-3 is binding to MHC Class II molecules.

The term "monkey LAG-3" is intended to encompass LAG-3 proteins expressed by Old World and New World monkeys, including but not limited to cynomolgus monkey LAG-3 and rhesus monkey LAG-3. A representative amino acid sequence for monkey LAG-3 is the rhesus monkey LAG-3 amino acid sequence shown in Figure 19 and SEQ ID NO: 85, which is also deposited as Genbank Accession No. XM_001108923. Another representative amino acid sequence for monkey LAG-3 is the alternative rhesus monkey sequence of clone pa23-5 shown in Figure 19 and SEQ ID NO: 84, isolated as described in Example 3A, subsection 3. This alternative rhesus sequence exhibits a single amino acid difference, at position 419, as compared to the Genbank-deposited sequence.

A particular human LAG-3 sequence will generally be at least 90% identical in amino acids sequence to human LAG-3 of Genbank Accession No. NP_002277 and contains amino acid residues that identify the amino acid sequence as being human when compared to LAG-3 amino acid sequences of other species (*e.g.*, murine). In certain cases, a human LAG-3 can be at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98%, or 99% identical in amino acid sequence to LAG-3 of Genbank Accession No. NP_002277. In certain embodiments, a human LAG-3 sequence will display no more than 10 amino acid differences from the LAG-3 sequence of Genbank Accession No. NP_002277. In certain embodiments, the human LAG-3 can display no more than 5, or even no more

than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the LAG-3 sequence of Genbank Accession No. NP_002277. Percent identity can be determined as described herein.

The term "immune response" refers to the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

10 An "antigen-specific T cell response" refers to responses by a T cell that result from stimulation of the T cell with the antigen for which the T cell is specific. Non-limiting examples of responses by a T cell upon antigen-specific stimulation include proliferation and cytokine production (*e.g.*, IL-2 production).

The term "antibody" as referred to herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chains thereof. Whole antibodies are glycoproteins comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, C_{H1} , C_{H2} and C_{H3} . Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L . The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies can mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

30 The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, a LAG-3 protein). It has been shown that

the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and C_{H1} domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent
5 fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fab' fragment, which is essentially an Fab with part of the hinge region (*see*, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) a Fd fragment consisting of the V_H and C_{H1} domains; (v) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (vi) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature*
10 341:544-546), which consists of a V_H domain; (vii) an isolated complementarity determining region (CDR); and (viii) a nanobody, a heavy chain variable region containing a single variable domain and two constant domains. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be
15 made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); *see e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. These antibody fragments are obtained using
20 conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds a LAG-3 protein is substantially free of
25 antibodies that specifically bind antigens other than LAG-3 proteins). An isolated antibody that specifically binds a human LAG-3 protein may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as LAG-3 proteins from other species. Moreover, an isolated antibody can be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used
30 herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

The term "human antibody", as used herein, is intended to include antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies of the invention can include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*). However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

The term "human monoclonal antibody" refers to antibodies displaying a single binding specificity, which have variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal, *e.g.*, a transgenic mouse, having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene fused to an immortalized cell.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L

sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

The term "isotype" refers to the antibody class (*e.g.*, IgM or IgG1) that is encoded by the heavy chain constant region genes.

- 5 The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen."

The term "human antibody derivatives" refers to any modified form of the human antibody, *e.g.*, a conjugate of the antibody and another agent or antibody.

- 10 The term "humanized antibody" is intended to refer to antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences. Additional framework region modifications can be made within the human framework sequences.

- 15 The term "chimeric antibody" is intended to refer to antibodies in which the variable region sequences are derived from one species and the constant region sequences are derived from another species, such as an antibody in which the variable region sequences are derived from a mouse antibody and the constant region sequences are derived from a human antibody.

- 20 As used herein, an antibody that "specifically binds human LAG-3" is intended to refer to an antibody that binds to human LAG-3 protein (and possibly a LAG-3 protein from one or more non-human species) but does not substantially bind to non-LAG-3 proteins. Preferably, the antibody binds to a human LAG-3 protein with "high affinity", namely with a K_D of 1×10^{-7} M or less, more preferably 5×10^{-8} M or less, more preferably 3×10^{-8} M or less, more preferably 1×10^{-8} M or less, more preferably 5×10^{-9} M or less or even more preferably 1×10^{-9} M or less.
- 25

- 30 The term "does not substantially bind" to a protein or cells, as used herein, means does not bind or does not bind with a high affinity to the protein or cells, *i.e.* binds to the protein or cells with a K_D of 1×10^{-6} M or more, more preferably 1×10^{-5} M or more, more preferably 1×10^{-4} M or more, more preferably 1×10^{-3} M or more, even more preferably 1×10^{-2} M or more.

The term " K_{assoc} " or " K_a ", as used herein, is intended to refer to the association rate of a particular antibody-antigen interaction, whereas the term " K_{dis} " or " K_d ", as used herein, is intended to refer to the dissociation rate of a particular antibody-antigen

interaction. The term " K_D ," as used herein, is intended to refer to the dissociation constant, which is obtained from the ratio of K_d to K_a (*i.e.*, K_d/K_a) and is expressed as a molar concentration (M). K_D values for antibodies can be determined using methods well established in the art. A preferred method for determining the K_D of an antibody is
 5 by using surface plasmon resonance, preferably using a biosensor system such as a Biacore[®] system.

The term "high affinity" for an IgG antibody refers to an antibody having a K_D of 1×10^{-7} M or less, more preferably 5×10^{-8} M or less, even more preferably 1×10^{-8} M or less, even more preferably 5×10^{-9} M or less and even more preferably 1×10^{-9} M or less
 10 for a target antigen. However, "high affinity" binding can vary for other antibody isotypes. For example, "high affinity" binding for an IgM isotype refers to an antibody having a K_D of 10^{-6} M or less, more preferably 10^{-7} M or less, even more preferably 10^{-8} M or less.

The term "subject" includes any human or nonhuman animal. The term
 15 "nonhuman animal" includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows, horses, chickens, amphibians, and reptiles, although mammals are preferred, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows and horses.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following
 20 subsections.

Anti-LAG-3 Antibodies Having Particular Functional Properties

The antibodies of the invention are characterized by particular functional features or properties of the antibodies. For example, the antibodies specifically bind to human
 25 LAG-3 and may bind to LAG-3 from certain other species, *e.g.*, monkey LAG-3 (*e.g.*, cynomolgus monkey, rhesus monkey), but do not substantially bind to LAG-3 from certain other species, *e.g.*, mouse LAG-3. Preferably, an antibody of the invention binds to human LAG-3 with high affinity.

The ability of the antibody to stimulate an immune response, such as an antigen-
 30 specific T cell response, can be indicated by, for example, the ability of the antibody to stimulate interleukin-2 (IL-2) production in an antigen-specific T cell response. In certain embodiments, an antibody of the invention binds to human LAG-3 and exhibits an ability to stimulate an antigen-specific T cell response. In other embodiments, an antibody of the invention binds to human LAG-3 but does not exhibit an ability to

stimulate an antigen-specific T cell response. Other means by which to evaluate the ability of the antibody to stimulate an immune response include the ability of the antibody to inhibit tumor growth, such as in an *in vivo* tumor graft model (*see, e.g.*, Example 6) or the ability of the antibody to stimulate an autoimmune response, such as

5 the ability to promote the development of an autoimmune disease in an autoimmune model, such as the ability to promote the development of diabetes in the NOD mouse model (*see, e.g.*, Example 7).

The binding of an antibody of the invention to LAG-3 can be assessed using one or more techniques well established in the art. For example, in a preferred

10 embodiment, an antibody can be tested by a flow cytometry assay in which the antibody is reacted with a cell line that expresses human LAG-3, such as CHO cells that have been transfected to express LAG-3 (*e.g.*, human LAG-3, or monkey LAG-3 (*e.g.*, rhesus or cynomolgus monkey) or mouse LAG-3) on their cell surface (*see, e.g.*, Example 3A for a suitable assay). Other suitable cells for use in flow cytometry assays include anti-

15 CD3-stimulated CD4⁺ activated T cells, which express native LAG-3. Additionally or alternatively, the binding of the antibody, including the binding kinetics (*e.g.*, K_D value) can be tested in BIAcore binding assays (*see, e.g.*, Example 3B for suitable assays). Still other suitable binding assays include ELISA assays, for example using a recombinant LAG-3 protein (*see, e.g.*, Example 1 for a suitable assay).

20 Preferably, an antibody of the invention binds to a LAG-3 protein with a K_D of 5 x 10⁻⁸ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 2 x 10⁻⁸ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 5 x 10⁻⁹ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 4 x 10⁻⁹ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 3 x 10⁻⁹ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 2 x 10⁻⁹ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 1

25 x 10⁻⁹ M or less, binds to a LAG-3 protein with a K_D of 5 x 10⁻¹⁰ M or less, or binds to a LAG-3 protein with a K_D of 1 x 10⁻¹⁰ M or less.

Typically, an antibody of the invention binds to LAG-3 in lymphoid tissues, such as tonsil, spleen or thymus, which can be detected by immunohistochemistry. Additionally, as described further in Example 8, certain anti-LAG-3 antibodies of the

30 invention stain pituitary tissue (*e.g.*, are retained in the pituitary) as measured by immunohistochemistry, whereas other anti-LAG-3 antibodies of the invention do not stain pituitary tissue (*e.g.*, are not retained in the pituitary) as measured by immunohistochemistry. Thus, in one embodiment, the invention provides a human anti-

LAG-3 antibody that stains pituitary tissue by immunohistochemistry, whereas in another embodiment, the invention provides a human anti-LAG-3 antibody that does not stain pituitary tissue by immunohistochemistry.

Preferred antibodies of the invention are human monoclonal antibodies.

- 5 Additionally or alternatively, the antibodies can be, for example, chimeric or humanized monoclonal antibodies.

Monoclonal Antibodies 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5

- 10 Preferred antibodies of the invention are the human monoclonal antibodies 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 isolated and structurally characterized as described in Examples 1 and 2. The V_H amino acid sequences of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 37-42, respectively. The V_K amino acid sequences of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 43-48, respectively.

- 15 Given that each of these antibodies can bind to human LAG-3, the V_H and V_L sequences can be "mixed and matched" to create other anti-LAG-3 binding molecules of the invention. Preferably, when V_H and V_L chains are mixed and matched, a V_H sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_H sequence. Likewise, preferably a V_L sequence from a particular V_H/V_L pairing is
20 replaced with a structurally similar V_L sequence.

Accordingly, in one aspect, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising:

- (a) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-42; and
25 (b) a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 43-48;
wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

Preferred heavy and light chain combinations include:

- (a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:
30 37 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43;
(b) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44;

(c) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45;

(d) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46;

(e) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47; or

(f) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

In another aspect, this disclosure provides antibodies that comprise the heavy chain and light chain CDR1s, CDR2s and CDR3s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5, or combinations thereof. The amino acid sequences of the V_H CDR1s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 37-42, respectively. The amino acid sequences of the V_H CDR2s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 43-48, respectively. The amino acid sequences of the V_H CDR3s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR1s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 19-24 respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR2s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 25-30. The amino acid sequences of the V_K CDR3s of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 31-36, respectively. The CDR regions are delineated using the Kabat system (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Given that each of these antibodies can bind to human LAG-3 and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, the V_H CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and V_L CDR1, CDR2, and CDR3 sequences can be "mixed and matched" (*i.e.*, CDRs from different antibodies can be mixed and match, although each antibody must contain a V_H CDR1, CDR2, and CDR3 and a V_L CDR1, CDR2, and CDR3) to create other anti-LAG-3 binding molecules of the

invention. LAG-3 binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using the binding assays described above and in the Examples (*e.g.*, ELISAs, Biacore[®] analysis). Preferably, when V_H CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_H sequence is replaced with a

5 structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when V_L CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_L sequence preferably is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan that novel V_H and V_L sequences can be created by substituting one or more V_H and/or V_L CDR region sequences with structurally

10 similar sequences from the CDR sequences disclosed herein for monoclonal antibodies 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5.

Accordingly, in another aspect, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected
 - 15 from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-6;
 - (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7-12;
 - (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18;
 - 20 (d) a light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-24;
 - (e) a light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25-30; and
 - (f) a light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected
 - 25 from the group consisting of SEQ ID NOs: 31-36;
- wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

In a preferred embodiment, the antibody comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 1;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 7;
- 30 (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 13;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 19;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 25; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 31.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 2;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 8;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 14;
- 5 (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 20;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 26; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 32.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 3;
- 10 (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 9;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising GGY;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 21;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 27; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 33.

15 In another preferred embodiment, the antibody comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 4;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 10;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 16;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 22;
- 20 (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 28; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 34.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 5;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 11;
- 25 (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 17;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 29; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 35.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

- 30 (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 6;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 12;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 18;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 24;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 30; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 36.

It is well known in the art that the CDR3 domain, independently from the CDR1 and/or CDR2 domain(s), alone can determine the binding specificity of an antibody for a cognate antigen and that multiple antibodies can predictably be generated having the same binding specificity based on a common CDR3 sequence. *See, e.g., Klimka et al., British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); *Beiboer et al., J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); *Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998); *Barbas et al., J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994); *Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995); *Ditzel et al., J. Immunol.* 157:739-749 (1996); *Berezov et al., BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); *Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995); *Bourgeois et al., J. Virol* 72:807-10 (1998); *Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993); *Polymenis and Stoller, J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) and *Xu and Davis, Immunity* 13:37-45 (2000). *See also*, US Patents Nos. 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 and 5,760,185. Each of these references is hereby incorporated by reference in its entirety.

Accordingly, the present disclosure provides monoclonal antibodies comprising one or more heavy and/or light chain CDR3 domains from an antibody derived from a human or non-human animal, wherein the monoclonal antibody is capable of specifically binding to human LAG-3. Within certain aspects, the present disclosure provides monoclonal antibodies comprising one or more heavy and/or light chain CDR3 domain from a non-human antibody, such as a mouse or rat antibody, wherein the monoclonal antibody is capable of specifically binding to LAG-3. Within some embodiments, such inventive antibodies comprising one or more heavy and/or light chain CDR3 domain from a non-human antibody (a) are capable of competing for binding with; (b) retain the functional characteristics; (c) bind to the same epitope; and/or (d) have a similar binding affinity as the corresponding parental non-human antibody.

Within other aspects, the present disclosure provides monoclonal antibodies comprising one or more heavy and/or light chain CDR3 domain from a human antibody, such as, *e.g.*, a human antibody obtained from a non-human animal, wherein the human antibody is capable of specifically binding to human LAG-3. Within other aspects, the present disclosure provides monoclonal antibodies comprising one or more heavy and/or

light chain CDR3 domain from a first human antibody, such as, for example, a human antibody obtained from a non-human animal, wherein the first human antibody is capable of specifically binding to human LAG-3 and wherein the CDR3 domain from the first human antibody replaces a CDR3 domain in a human antibody that is lacking
 5 binding specificity for LAG-3 to generate a second human antibody that is capable of specifically binding to human LAG-3. Within some embodiments, such inventive antibodies comprising one or more heavy and/or light chain CDR3 domain from the first human antibody (a) are capable of competing for binding with; (b) retain the functional characteristics; (c) bind to the same epitope; and/or (d) have a similar binding affinity as
 10 the corresponding parental first human antibody.

Antibodies Having Particular Germline Sequences

In certain embodiments, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable region from a particular germline heavy chain immunoglobulin gene and/or a
 15 light chain variable region from a particular germline light chain immunoglobulin gene.

For example, in a preferred embodiment, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-20 gene, a human V_H 4-34 gene, a human V_H 3-33 gene or a human V_H 1-24 gene, wherein the antibody
 20 specifically binds human LAG-3. In another preferred embodiment, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L18 gene, a human V_K L6 gene or a human V_K A27 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In yet another preferred embodiment, this disclosure
 25 provides an isolated monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-20 gene and comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L18 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In yet another preferred embodiment, this disclosure provides an
 30 isolated monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-34 gene and comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In yet another preferred embodiment, this disclosure provides an isolated monoclonal

antibody, or antigen-binding portion thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-33 gene and comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K A27 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In yet another
5 preferred embodiment, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 1-24 gene and comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3. In yet another preferred
10 embodiment, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-33 gene and comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

15 Such antibodies can also possess one or more of the functional characteristics described in detail above, such as high affinity binding to human LAG-3, binding to monkey LAG-3, lack of binding to mouse LAG-3, the ability to inhibit binding of LAG-3 to MHC Class II molecules and/or the ability to stimulate antigen-specific T cell responses.

20 An example of an antibody having V_H and V_L of V_H 3-20 and V_K L18, respectively, is the 25E3 antibody. Examples of antibodies having V_H and V_L of V_H 4-34 and V_K L6, respectively, are the 25F7 and 8B7 antibodies. An example of an antibody having V_H and V_L of V_H 3-33 and V_K A27, respectively, is the 26H10 antibody. An example of an antibody having V_H and V_L of V_H 1-24 and V_K L6, respectively, is the 11F2 antibody. An example of an antibody having V_H and V_L of V_H
25 3-33 and V_K L6, respectively, is the 17E5 antibody.

As used herein, a human antibody comprises heavy or light chain variable regions that is "the product of" or "derived from" a particular germline sequence if the variable regions of the antibody are obtained from a system that uses human germline
30 immunoglobulin genes. Such systems include immunizing a transgenic mouse carrying human immunoglobulin genes with the antigen of interest or screening a human immunoglobulin gene library displayed on phage with the antigen of interest. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a human germline immunoglobulin

sequence can be identified as such by comparing the amino acid sequence of the human antibody to the amino acid sequences of human germline immunoglobulins and selecting the human germline immunoglobulin sequence that is closest in sequence (*i.e.*, greatest % identity) to the sequence of the human antibody. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a particular human germline immunoglobulin sequence can contain amino acid differences as compared to the germline sequence, due to, for example, naturally-occurring somatic mutations or intentional introduction of site-directed mutation. However, a selected human antibody typically is at least 90% identical in amino acids sequence to an amino acid sequence encoded by a human germline immunoglobulin gene and contains amino acid residues that identify the human antibody as being human when compared to the germline immunoglobulin amino acid sequences of other species (*e.g.*, murine germline sequences). In certain cases, a human antibody can be at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98%, or 99% identical in amino acid sequence to the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene. Typically, a human antibody derived from a particular human germline sequence will display no more than 10 amino acid differences from the amino acid sequence encoded by the human germline immunoglobulin gene. In certain cases, the human antibody can display no more than 5, or even no more than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene.

Homologous Antibodies

In yet another embodiment, an antibody of the invention comprises heavy and light chain variable regions comprising amino acid sequences that are homologous to the amino acid sequences of the preferred antibodies described herein, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-LAG-3 antibodies of the invention. For example, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein:

- (a) the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-42;

(b) the light chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 43-48; and

(c) the antibody specifically binds to human LAG-3.

5 Additionally or alternatively, the antibody can possess one or more of the following functional properties discussed above, such as high affinity binding to human LAG-3, binding to monkey LAG-3, lack of binding to mouse LAG-3, the ability to inhibit binding of LAG-3 to MHC Class II molecules and/or the ability to stimulate antigen-specific T cell responses.

10 In various embodiments, the antibody can be, for example, a human antibody, a humanized antibody or a chimeric antibody.

 In other embodiments, the V_H and/or V_L amino acid sequences can be 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homologous to the sequences set forth above. An antibody having V_H and V_L regions having high (*i.e.*, 80% or greater) homology to the V_H and V_L regions of the sequences set forth above, can be obtained by mutagenesis (*e.g.*, site-directed or PCR-mediated mutagenesis) of nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 49-54 or 55-60, followed by testing of the encoded altered antibody for retained function (*i.e.*, the functions set forth above) using the functional assays described herein.

20 As used herein, the percent homology between two amino acid sequences is equivalent to the percent identity between the two sequences. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % homology = # of identical positions/total # of positions x 100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm, as described in the non-limiting examples below.

 The percent identity between two amino acid sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into

the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

Additionally or alternatively, the protein sequences of the present disclosure can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, *e.g.*, to identify related sequences. Such searches can be performed using the XBLAST program (version 2.0) of Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to the antibody molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) are useful. See www.ncbi.nlm.nih.gov.

15 Antibodies with Conservative Modifications

In certain embodiments, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, wherein one or more of these CDR sequences comprise specified amino acid sequences based on the preferred antibodies described herein (*e.g.*, 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2, 17E5), or conservative modifications thereof, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-LAG-3 antibodies of the invention. It is understood in the art that certain conservative sequence modification can be made which do not remove antigen binding. See, *e.g.*, Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt *et al.* (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy *et al.* (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 and Beers *et al.* (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43. Accordingly, this disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein:

(a) the heavy chain variable region CDR3 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18, and conservative modifications thereof;

5 (b) the light chain variable region CDR3 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequence of SEQ ID NOs: 31-36, and conservative modifications thereof; and

(c) the antibody specifically binds human LAG-3.

10 Additionally or alternatively, the antibody can possess one or more of the following functional properties described above, such as high affinity binding to human LAG-3, binding to monkey LAG-3, lack of binding to mouse LAG-3, the ability to inhibit binding of LAG-3 to MHC Class II molecules and/or the ability to stimulate antigen-specific T cell responses.

15 In a preferred embodiment, the heavy chain variable region CDR2 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 7-12, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR2 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 25-30, and conservative modifications thereof. In another preferred embodiment, the heavy chain variable region CDR1 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 1-6, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR1 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 19-24, and conservative modifications thereof.

25 In various embodiments, the antibody can be, for example, human antibodies, humanized antibodies or chimeric antibodies.

30 As used herein, the term "conservative sequence modifications" is intended to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into an antibody of the invention by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative amino acid substitutions are ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having

similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid residues within the CDR regions of an antibody of the invention can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered antibody can be tested for retained function (*i.e.*, the functions set forth above) using the functional assays described herein.

Antibodies that Bind to the Same Epitope as Anti-LAG-3 Antibodies

In another embodiment, this disclosure provides antibodies that bind to the same epitope on LAG-3 as any of the anti-LAG-3 monoclonal antibodies of the invention (*i.e.*, antibodies that have the ability to cross-compete for binding to human LAG-3 with any of the monoclonal antibodies of the invention). In preferred embodiments, the reference antibody for cross-competition studies can be the monoclonal antibodies 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5.

Such cross-competing antibodies can be identified based on their ability to cross-compete with 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and/or 17E5 in standard LAG-3 binding assays. For example, standard ELISA assays can be used in which a recombinant human LAG-3 protein is immobilized on the plate, one of the antibodies is fluorescently labeled and the ability of non-labeled antibodies to compete off the binding of the labeled antibody is evaluated. Additionally or alternatively, BIAcore analysis can be used to assess the ability of the antibodies to cross-compete. The ability of a test antibody to inhibit the binding of, for example, 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and/or 17E5, to human LAG-3 demonstrates that the test antibody can compete with 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and/or 17E5 for binding to human LAG-3 and thus binds to the same epitope on human LAG-3 as 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and/or 17E5. In a preferred embodiment, the antibody that binds to the same epitope on human LAG-3 as 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 or 17E5 is a human monoclonal antibody. Such human monoclonal antibodies can be prepared and isolated as described in the Examples.

As discussed further in Example 3C, the binding of 25E3, 25F7 and 8B7 to human LAG-3 has been mapped to an "extra loop" region within the first extracellular domain of human LAG-3. The sequence of the extra loop region is set forth in SEQ ID NO: 79. Using a peptide scan experiment, the binding of 25E3 to the extra loop region has been mapped to the following amino acid sequence: PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), whereas the binding of 25F7 to the extra loop region has been mapped to the following amino acid sequence: HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77) and the binding of 8B7 to the extra loop region has been mapped to the following amino acid sequence: PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). Accordingly, in a preferred embodiment, the invention provides an anti-LAG-3 antibody that binds an epitope of human LAG-3 comprising the amino acid sequence PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76). In another preferred embodiment, the invention provides an anti-LAG-3 antibody that binds an epitope of human LAG-3 comprising the amino acid sequence HPAPPSSW (SEQ ID NO: 77) or PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78).

15 Engineered and Modified Antibodies

An antibody of the invention further can be prepared using an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences disclosed herein as starting material to engineer a modified antibody, which modified antibody may have altered properties from the starting antibody. An antibody can be engineered by modifying one or more residues within one or both variable regions (*i.e.*, V_H and/or V_L), for example within one or more CDR regions and/or within one or more framework regions. Additionally or alternatively, an antibody can be engineered by modifying residues within the constant region(s), for example to alter the effector function(s) of the antibody.

25 In certain embodiments, CDR grafting can be used to engineer variable regions of antibodies. Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain complementarity determining regions (CDRs). For this reason, the amino acid sequences within CDRs are more diverse between individual antibodies than sequences outside of CDRs.

30 Because CDR sequences are responsible for most antibody-antigen interactions, it is possible to express recombinant antibodies that mimic the properties of specific naturally occurring antibodies by constructing expression vectors that include CDR sequences from the specific naturally occurring antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (*see, e.g., Riechmann et al.*

(1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Pat. Nos. 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370.)

Accordingly, another embodiment of the invention pertains to an isolated
 5 monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain
 variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino
 acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-6, SEQ ID NOs: 7-
 12, and SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18, respectively, and a light chain variable
 10 region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid
 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-24, SEQ ID NOs: 25-
 30, and SEQ ID NOs: 31-36, respectively. Thus, such antibodies contain the V_H and V_L
 CDR sequences of monoclonal antibodies 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5 can
 contain different framework sequences from these antibodies.

Such framework sequences can be obtained from public DNA databases or
 15 published references that include germline antibody gene sequences. For example,
 germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be
 found in the "VBase" human germline sequence database (available on the Internet at
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), as well as in Kabat *et al.* (1991), cited *supra*;
 Tomlinson *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals
 20 about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.*
227:776-798; and Cox *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments
 Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; the contents of each
 of which are expressly incorporated herein by reference. As another example, the
 germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be
 25 found in the Genbank database. For example, the following heavy chain germline
 sequences found in the HCo7 HuMAb mouse are available in the accompanying
 Genbank Accession Nos.: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 3-33
 (NG_0010109 & NT_024637) and 3-7 (NG_0010109 & NT_024637). As another
 example, the following heavy chain germline sequences found in the HCo12 HuMAb
 30 mouse are available in the accompanying Genbank Accession Nos.: 1-69 (NG_0010109,
 NT_024637 & BC070333), 5-51 (NG_0010109 & NT_024637), 4-34 (NG_0010109 &
 NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) & 3-23 (AJ406678).

Antibody protein sequences are compared against a compiled protein sequence database using one of the sequence similarity searching methods called the Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997), *supra*), which is well known to those skilled in the art.

Preferred framework sequences for use in the antibodies of the invention are
 5 those that are structurally similar to the framework sequences used by selected antibodies of the invention, *e.g.*, similar to the V_H 3-20 (SEQ ID NO: 69), V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61), V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65) or V_H 1-24 (SEQ ID NO: 73) framework sequences and/or the V_K L18 (SEQ ID NO: 71), V_K L6 (SEQ ID NO: 63) or V_K A27 (SEQ ID NO: 67) framework sequences used by preferred monoclonal antibodies of the
 10 invention. The V_H CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, and the V_K CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, can be grafted onto framework regions that have the identical sequence as that found in the germline immunoglobulin gene from which the framework sequence derive, or the CDR sequences can be grafted onto framework regions that contain one or more mutations as compared to the germline sequences. For example, it
 15 has been found that in certain instances it is beneficial to mutate residues within the framework regions to maintain or enhance the antigen binding ability of the antibody (*see e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370).

Another type of variable region modification is to mutate amino acid residues within the V_H and/or V_L CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions to thereby improve one or
 20 more binding properties (*e.g.*, affinity) of the antibody of interest. Site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis can be performed to introduce the mutation(s) and the effect on antibody binding, or other functional property of interest, can be evaluated in *in vitro* or *in vivo* assays as described herein and provided in the Examples. Preferably conservative modifications (as discussed above) are introduced.
 25 The mutations can be amino acid substitutions, additions or deletions, but are preferably substitutions. Moreover, typically no more than one, two, three, four or five residues within a CDR region are altered.

Accordingly, in another embodiment, the instant disclosure provides isolated anti-LAG-3 monoclonal antibodies, or antigen binding portions thereof, comprising a
 30 heavy chain variable region comprising: (a) a V_H CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-6, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 1-6; (b) a V_H CDR2 region comprising an amino

acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7-12, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 7-12; (c) a V_H CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18; (d) a V_L CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-24, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 19-24; (e) a V_L CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25-30, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 25-30; and (f) a V_L CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 31-36, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 31-36.

Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within V_H and/or V_L, *e.g.* to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation can contain framework residues that differ from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived.

For example, Table A shows regions where a framework region amino acid position (using Kabat numbering system) differs from the germline and how this position can be backmutated to the germline by the indicated substitutions:

Table A – Exemplary Backmutations		
Region	Framework Amino Acid Position (Kabat Numbering)	Backmutation
25E3 V _H	72	G72R
25E3 V _H	95	Y95H
25E3 V _H	97	T97A
25E3 V _H	98	T98R
25F7 V _H	69	L69I
25F7 V _H	71	L71V

25F7 V _H	83	R83S
25F7 V _H	97	F97R
8B7 V _H	76	K76N
8B7 V _H	79	A79S
8B7 V _H	83	N83S
8B7 V _H	112	P112Q
11F2 V _H	3	D3A
17E5 V _H	3	H3Q
8B7 V _H	59	C59Y
8B7 V _H	59	C59S

Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in further detail in U.S. Patent Publication No. 20030153043.

In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the invention can be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the invention can be chemically modified (*e.g.*, one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these embodiments is described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

In a preferred embodiment, the antibody is an IgG4 isotype antibody comprising a Serine to Proline mutation at a position corresponding to position 228 (S228P; EU index) in the hinge region of the heavy chain constant region. This mutation has been reported to abolish the heterogeneity of inter-heavy chain disulfide bridges in the hinge region (Angal *et al. supra*; position 241 is based on the Kabat numbering system). For example, in various embodiments, an anti-LAG-3 antibody of the invention can comprise the heavy chain variable region of 25F7 (SEQ ID NO: 37) or 26H10 (SEQ ID NO: 38) linked to a human IgG4 constant region in which the Serine at a position corresponding to position 241 as described in Angal *et al., supra*, has been mutated to Proline. Thus, for the 25F7 and 26H10 heavy chain variable regions linked to a human IgG4 constant region, this mutation corresponds to an S228P mutation by the EU index.

In one embodiment, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, *e.g.*, increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425. The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the
5 light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

In another embodiment, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired Staphylococcal protein A (SpA)
10 binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745.

In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No.
15 6,277,375. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022.

In yet other embodiments, the Fc region is altered by replacing at least one amino
20 acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is
25 altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260.

In another example, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent
30 cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,194,551.

In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351.

In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This approach is described further in PCT Publication WO 00/42072. Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγR1, FcγR2, FcγR3 and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (*see* Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to FcγR3. Additionally, the following combination mutants were shown to improve FcγR3 binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

In still another embodiment, the glycosylation of an antibody is modified. For example, an aglycosylated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. *See, e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861.

Additionally or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNAc structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used as host

cells in which to express recombinant antibodies of the invention to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (α (1,6)-fucosyltransferase), such that antibodies expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their

5 carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 FUT8^{-/-} cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (see U.S. Patent Publication No. 20040110704 and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). As another example, EP 1,176,195 describes a cell line

10 with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the α -1,6 bond-related enzyme. EP 1,176,195 also describes cell lines which have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835

15 describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Antibodies with a modified glycosylation profile can also be produced in chicken eggs, as described in PCT Publication WO 06/089231. Alternatively, antibodies

20 with a modified glycosylation profile can be produced in plant cells, such as *Lemna*. Methods for production of antibodies in a plant system are disclosed in the U.S. Patent application corresponding to Alston & Bird LLP attorney docket No. 040989/314911, filed on August 11, 2006. PCT Publication WO 99/54342 describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (*e.g.*, β (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the

25 engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNAc structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternatively, the fucose residues of the antibody can be cleaved off using a fucosidase enzyme; *e.g.*, the fucosidase α -L-fucosidase removes fucosyl residues from

30 antibodies (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Another modification of the antibodies herein that is contemplated by this disclosure is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (*e.g.*, serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody,

or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Preferably, the pegylation is carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a

5 reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating

10 proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the invention. *See, e.g.,* EP 0 154 316 and EP 0 401 384.

Antibody Physical Properties

Antibodies of this disclosure can be characterized by their various physical

15 properties, to detect and/or differentiate different classes thereof.

Antibodies of the present disclosure can contain one or more glycosylation sites in either the light or heavy chain variable region. Such glycosylation sites may result in increased immunogenicity of the antibody or an alteration of the pK of the antibody due to altered antigen binding (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Glycosylation has been known to occur at motifs containing an N-X-S/T sequence. In some instances, it is preferred to have an anti-LAG-3 antibody that does not contain variable region

25 glycosylation. This can be achieved either by selecting antibodies that do not contain the glycosylation motif in the variable region or by mutating residues within the glycosylation region.

In a preferred embodiment, the antibodies of the present disclosure do not contain asparagine isomerism sites. The deamidation of asparagine may occur on N-G or D-G sequences and result in the creation of an isoaspartic acid residue that introduces a kink into the polypeptide chain and decreases its stability (isoaspartic acid effect).

30

Each antibody will have a unique isoelectric point (pI), which generally falls in the pH range between 6 and 9.5. The pI for an IgG1 antibody typically falls within the pH range of 7-9.5 and the pI for an IgG4 antibody typically falls within the pH range of

6-8. There is speculation that antibodies with a pI outside the normal range may have some unfolding and instability under *in vivo* conditions. Thus, it is preferred to have an anti-LAG-3 antibody that contains a pI value that falls in the normal range. This can be achieved either by selecting antibodies with a pI in the normal range or by mutating
 5 charged surface residues.

Each antibody will have a characteristic melting temperature, with a higher melting temperature indicating greater overall stability *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Generally, it is preferred that the T_{M1} (the temperature of initial unfolding) be greater than 60°C, preferably greater
 10 than 65°C, even more preferably greater than 70°C. The melting point of an antibody can be measured using differential scanning calorimetry (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) or circular dichroism (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

In a preferred embodiment, antibodies are selected that do not degrade rapidly.
 15 Degradation of an antibody can be measured using capillary electrophoresis (CE) and MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

In another preferred embodiment, antibodies are selected that have minimal aggregation effects, which can lead to the triggering of an unwanted immune response and/or altered or unfavorable pharmacokinetic properties. Generally, antibodies are
 20 acceptable with aggregation of 25% or less, preferably 20% or less, even more preferably 15% or less, even more preferably 10% or less and even more preferably 5% or less. Aggregation can be measured by several techniques, including size-exclusion column (SEC), high performance liquid chromatography (HPLC), and light scattering.

25 Methods of Engineering Antibodies

As discussed above, the anti-LAG-3 antibodies having V_H and V_L sequences disclosed herein can be used to create new anti-LAG-3 antibodies by modifying the V_H and/or V_L sequences, or the constant region(s) attached thereto. Thus, in another aspect of the invention, the structural features of an anti-LAG-3 antibody of the invention, *e.g.*
 30 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5, are used to create structurally related anti-LAG-3 antibodies that retain at least one functional property of the antibodies of the invention, such as binding to human LAG-3. For example, one or more CDR regions of 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5, or mutations thereof, can be combined recombinantly with known framework regions and/or other CDRs to create additional,

recombinantly-engineered, anti-LAG-3 antibodies of the invention, as discussed above. Other types of modifications include those described in the previous section. The starting material for the engineering method is one or more of the V_H and/or V_L sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. To create the engineered antibody, it is not necessary to actually prepare (*i.e.*, express as a protein) an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. Rather, the information contained in the sequence(s) is used as the starting material to create a "second generation" sequence(s) derived from the original sequence(s) and then the "second generation" sequence(s) is prepared and expressed as a protein.

Accordingly, in another embodiment, this disclosure provides a method for preparing an anti-LAG-3 antibody comprising:

(a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-6, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7-12, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-24, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25-30, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 31-36;

(b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and

(c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

Standard molecular biology techniques can be used to prepare and express the altered antibody sequence.

Preferably, the antibody encoded by the altered antibody sequence(s) is one that retains one, some or all of the functional properties of the anti-LAG-3 antibodies described herein, which functional properties include, but are not limited to:

- (i) high affinity binding to human LAG-3;
- (ii) binding to monkey LAG-3;
- (iii) lack of binding to mouse LAG-3
- (iv) an ability to inhibit binding of LAG-3 to MHC Class II molecules; and/or

(v) an ability to stimulate an immune response (*e.g.*, an antigen-specific T cell response).

The functional properties of the altered antibodies can be assessed using standard assays available in the art and/or described herein, such as those set forth in the

5 Examples.

In certain embodiments of the methods of engineering antibodies of the invention, mutations can be introduced randomly or selectively along all or part of an anti-LAG-3 antibody coding sequence and the resulting modified anti-LAG-3 antibodies can be screened for binding activity and/or other functional properties as described
10 herein. Mutational methods have been described in the art (*see, e.g.*, PCT Publications WO 02/092780 and WO 03/074679).

Nucleic Acid Molecules Encoding Antibodies of the Invention

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules that encode
15 the antibodies of the invention. The nucleic acids can be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when purified away from other cellular components or other contaminants, *e.g.*, other cellular nucleic acids or proteins, by standard techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel
20 electrophoresis and others well known in the art. *See*, Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of the invention can be, *e.g.*, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. In a preferred embodiment, the nucleic acid is a cDNA molecule.

Nucleic acids of the invention can be obtained using standard molecular biology
25 techniques. For antibodies expressed by hybridomas (*e.g.*, hybridomas prepared from transgenic mice carrying human immunoglobulin genes as described further below), cDNAs encoding the light and heavy chains of the antibody made by the hybridoma can be obtained by standard PCR amplification or cDNA cloning techniques. For antibodies obtained from an immunoglobulin gene library (*e.g.*, using phage display techniques), a
30 nucleic acid encoding such antibodies can be recovered from the gene library.

Preferred nucleic acids molecules of the invention are those encoding the V_H and V_L sequences of the 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 and 17E5 monoclonal antibodies. DNA sequences encoding the V_H sequences of 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 49-54, respectively. DNA sequences encoding the V_L

sequences of 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 and 17E5 are shown in SEQ ID NOs: 55-60, respectively.

Once DNA fragments encoding V_H and V_L segments are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes or to a scFv gene. In these manipulations, a V_L - or V_H -encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

The isolated DNA encoding the V_H region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the V_H -encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (*see e.g.*, Kabat *et al.* (1991), *supra*) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG4 constant region. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H -encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

The isolated DNA encoding the V_L region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the V_L -encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (*see e.g.*, Kabat *et al.*, *supra*) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. In preferred embodiments, the light chain constant region can be a kappa or lambda constant region.

To create a scFv gene, the V_H - and V_L -encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, *e.g.*, encoding the amino acid sequence (Gly₄-Ser)₃, such that the V_H and V_L sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the V_L and V_H regions joined by the flexible linker (*see e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Production of Monoclonal Antibodies of the Invention

Monoclonal antibodies (mAbs) of the present disclosure can be produced using the well-known somatic cell hybridization (hybridoma) technique of Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Other embodiments for producing monoclonal antibodies include viral or oncogenic transformation of B lymphocytes and phage display techniques. Chimeric or humanized antibodies are also well known in the art. See e.g., U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370, the contents of which are specifically incorporated herein by reference in their entirety.

In a preferred embodiment, the antibodies of the invention are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against human LAG-3 can be generated using transgenic or transchromosomal mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse system. These transgenic and transchromosomal mice include mice referred to herein as the HuMAb Mouse[®] and KM Mouse[®], respectively, and are collectively referred to herein as "human Ig mice."

The HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see e.g., Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ , and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgG κ monoclonal antibodies (Lonberg *et al.* (1994), *supra*; reviewed in Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, and Harding and Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Preparation and use of the HuMAb Mouse[®], and the genomic modifications carried by such mice, is further described in Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; and Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, the contents of all of which are hereby specifically incorporated by reference in their entirety. See

further, U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,770,429; and 5,545,807; PCT Publication Nos. WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 and WO 01/14424, the contents of which are incorporated herein by reference
5 in their entirety.

In another embodiment, human antibodies of the invention can be raised using a mouse that carries human immunoglobulin sequences on transgenes and transchromosomes, such as a mouse that carries a human heavy chain transgene and a human light chain transchromosome. This mouse is referred to herein as a "KM
10 mouse[®]," and is described in detail in PCT Publication WO 02/43478. A modified form of this mouse, which further comprises a homozygous disruption of the endogenous FcγRIIB receptor gene, is also described in PCT Publication WO 02/43478 and referred to herein as a "KM/FCGR2D mouse[®]." In addition, mice with either the HCo7 or HCo12 heavy chain transgenes or both can be used.

15 Additional transgenic animal embodiments include the Xenomouse (Abgenix, Inc., U.S. Patent Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 and 6,162,963). Further embodiments include "TC mice" (Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727) and cows carrying human heavy and light chain transchromosomes (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894; PCT Publication WO
20 02/092812). The contents of these patents and publications are specifically incorporated herein by reference in their entirety.

In one embodiment, human monoclonal antibodies of the invention are prepared using phage display methods for screening libraries of human immunoglobulin genes. *See, e.g.* U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; 5,571,698; 5,427,908; 5,580,717;
25 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; and 6,593,081, the contents of which are incorporated herein by reference in their entirety.

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using SCID mice into which human immune cells have been reconstituted such that a human antibody response can be generated upon immunization. *See, e.g., U.S. Patent Nos.*
30 5,476,996 and 5,698,767, the contents of which are incorporated herein by reference in their entirety.

In another embodiment, human anti-LAG-3 antibodies are prepared using phage display where the phages comprise nucleic acids encoding antibodies generated in transgenic animals previously immunized with LAG-3. In a preferred embodiment, the transgenic animal is a HuMab, KM, or Kirin mouse. *See, e.g.* U.S. Patent No. 6,794,132, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety.

Immunization of Human Ig Mice

In one embodiment of the invention, human Ig mice are immunized with a purified or enriched preparation of a LAG-3 antigen, recombinant LAG-3 protein, or cells expressing a LAG-3 protein. *See, e.g.,* Lonberg *et al.* (1994), *supra*; Fishwild *et al.* (1996), *supra*; PCT Publications WO 98/24884 or WO 01/14424, the contents of which are incorporated herein by reference in their entirety. In a preferred embodiment, 6-16 week old mice are immunized with 5-50 μ g of LAG-3 protein. Alternatively, a portion of LAG-3 fused to a non-LAG-3 polypeptide is used.

In one embodiment, the transgenic mice are immunized intraperitoneally (IP) or intravenously (IV) with LAG-3 antigen in complete Freund's adjuvant, followed by subsequent IP or IV immunizations with antigen in incomplete Freund's adjuvant. In other embodiments, adjuvants other than Freund's or whole cells in the absence of adjuvant are used. The plasma can be screened by ELISA and cells from mice with sufficient titers of anti-LAG-3 human immunoglobulin can be used for fusions.

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies of the Invention

To generate hybridomas producing human monoclonal antibodies of the invention, splenocytes and/or lymph node cells from immunized mice can be isolated and fused to an appropriate immortalized cell line, such as a mouse myeloma cell line. The resulting hybridomas can be screened for the production of antigen-specific antibodies. Generation of hybridomas is well-known in the art. *See, e.g.,* Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York.

Generation of Transfectomas Producing Monoclonal Antibodies of the Invention

Antibodies of the invention also can be produced in a host cell transfectoma using, for example, a combination of recombinant DNA techniques and gene transfection methods as is well known in the art (*e.g.,* Morrison, S. (1985) *Science*

229:1202). In one embodiment, DNA encoding partial or full-length light and heavy chains obtained by standard molecular biology techniques is inserted into one or more expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational regulatory sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene.

The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, *e.g.*, in Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP) and polyoma. Alternatively, nonviral regulatory sequences can be used, such as the ubiquitin promoter or β -globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SR α promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1 (Takebe *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used.

The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into the same or separate expression vectors. In preferred embodiments, the variable regions are used to create full-length antibody genes of any antibody isotype by inserting them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions of the desired isotype such that the V_H segment is operatively linked to the C_H segment(s) within the vector and the V_L segment is operatively linked to the C_L segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal

peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention can carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (*see, e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,399,216; 4,634,665 and 5,179,017). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr-host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and most preferably mammalian host cells, is the most preferred because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody.

Preferred mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr⁻ CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), NSO myeloma cells, COS cells and SP2 cells. In particular, for use with NSO myeloma cells, another preferred expression system is the GS gene expression system disclosed in WO 87/04462, WO 89/01036 and EP 338,841. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more

preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

5 Characterization of Antibody Binding to Antigen

Antibodies of the invention can be tested for binding to human LAG-3 by, for example, standard ELISA. Anti-LAG-3 human IgGs can be further tested for reactivity with a LAG-3 antigen by Western blotting. The binding specificity of an antibody of the invention can also be determined by monitoring binding of the antibody to cells
 10 expressing a LAG-3 protein, *e.g.*, flow cytometry. These methods are known in the art. *See, e.g.*, Harlow and Lane (1988), cited *supra*.

Immunoconjugates

Antibodies of this invention can be conjugated to a therapeutic agent to form an
 15 immunoconjugate such as an antibody-drug conjugate (ADC). Suitable therapeutic agents include antimetabolites, alkylating agents, DNA minor groove binders, DNA intercalators, DNA crosslinkers, histone deacetylase inhibitors, nuclear export inhibitors, proteasome inhibitors, topoisomerase I or II inhibitors, heat shock protein inhibitors, tyrosine kinase inhibitors, antibiotics, and anti-mitotic agents. In the ADC, the antibody
 20 and therapeutic agent preferably are conjugated via a linker cleavable such as a peptidyl, disulfide, or hydrazone linker. More preferably, the linker is a peptidyl linker such as Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO:15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, or Glu. The ADCs can be prepared as described in U.S. Patent Nos. 7,087,600; 6,989,452; and 7,129,261;
 25 PCT Publications WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; and WO 08/103693; U.S. Patent Publications 20060024317; 20060004081; and 20060247295; the disclosures of which are incorporated herein by reference.

30 Bispecific Molecules

In another aspect, the present disclosure features bispecific molecules comprising an anti-LAG-3 antibody linked to at least one other functional molecule, *e.g.*, another peptide or protein (*e.g.*, another antibody or ligand for a receptor) to generate a bispecific molecule that binds to at least two different binding sites or target molecules.

Thus, as used herein, "bispecific molecule" includes molecules that have three or more specificities. In a preferred embodiment, the bispecific molecule comprises a first binding specificity for LAG-3 and a second binding specificity for a triggering molecule that recruits cytotoxic effector cells that can kill a LAG-3 expressing target cell.

- 5 Examples of suitable triggering molecules are CD64, CD89, CD16, and CD3. *See, e.g., Kufer et al., TRENDS in Biotechnology, 22 (5), 238-244 (2004).*

In an embodiment, a bispecific molecule has, in addition to an anti-Fc binding specificity and an anti-LAG-3 binding specificity, a third specificity. The third specificity can be for an anti-enhancement factor (EF), *e.g.*, a molecule that binds to a
 10 surface protein involved in cytotoxic activity and thereby increases the immune response against the target cell. For example, the anti-enhancement factor can bind a cytotoxic T-cell (*e.g.* via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, or ICAM-1) or other immune cell, resulting in an increased immune response against the target cell.

Bispecific molecules can come in many different formats and sizes. At one end
 15 of the size spectrum, a bispecific molecule retains the traditional antibody format, except that, instead of having two binding arms of identical specificity, it has two binding arms each having a different specificity. At the other extreme are bispecific molecules consisting of two single-chain antibody fragments (scFv's) linked by a peptide chain, a so-called Bs(scFv)₂ construct. Intermediate-sized bispecific molecules include two
 20 different F(ab) fragments linked by a peptidyl linker. Bispecific molecules of these and other formats can be prepared by genetic engineering, somatic hybridization, or chemical methods. *See, e.g., Kufer et al, cited supra; Cao and Suresh, Bioconjugate Chemistry, 9 (6), 635-644 (1998); and van Spriël et al., Immunology Today, 21 (8), 391-397 (2000), and the references cited therein.*

25 Pharmaceutical Compositions

In another aspect, the present disclosure provides a pharmaceutical composition comprising an antibody of the present disclosure formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. It may optionally contain one or more additional
 30 pharmaceutically active ingredients, such as another antibody or a drug. The pharmaceutical compositions of the invention also can be administered in a combination therapy with, for example, another immunostimulatory agent, anti-cancer agent, an anti-viral agent, or a vaccine, such that the anti-LAG-3 antibody enhances the immune response against the vaccine.

The pharmaceutical composition can comprise any number of excipients. Excipients that can be used include carriers, surface active agents, thickening or emulsifying agents, solid binders, dispersion or suspension aids, solubilizers, colorants, flavoring agents, coatings, disintegrating agents, lubricants, sweeteners, preservatives, isotonic agents, and combinations thereof. The selection and use of suitable excipients is taught in Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), the disclosure of which is incorporated herein by reference.

Preferably, a pharmaceutical composition is suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (*e.g.*, by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound can be coated in a material to protect it from the action of acids and other natural conditions that may inactivate it. The phrase "parenteral administration" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion. Alternatively, an antibody of the invention can be administered via a non-parenteral route, such as a topical, epidermal or mucosal route of administration, *e.g.*, intranasally, orally, vaginally, rectally, sublingually or topically.

The pharmaceutical compounds of the invention can be in the form of pharmaceutically acceptable salts. A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound and does not impart any undesired toxicological effects. Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanolic acids, hydroxy alkanolic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium, magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines,

such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chlorprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

Pharmaceutical compositions can be in the form of sterile aqueous solutions or dispersions. They can also be formulated in a microemulsion, liposome, or other ordered
5 structure suitable to high drug concentration.

The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated and the particular mode of administration and will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred percent,
10 this amount will range from about 0.01% to about ninety-nine percent of active ingredient, preferably from about 0.1% to about 70%, most preferably from about 1% to about 30% of active ingredient in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a
15 therapeutic response). For example, a single bolus can be administered, several divided doses can be administered over time or the dose can be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to
20 physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required.

For administration of the antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100
25 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 0.3 mg/kg body weight, 1 mg/kg body weight, 3 mg/kg body weight, 5 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per week, once every two
30 weeks, once every three weeks, once every four weeks, once a month, once every 3 months or once every three to 6 months. Preferred dosage regimens for an anti-LAG-3 antibody of the invention include 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight via intravenous administration, with the antibody being given using one of the following

dosing schedules: (i) every four weeks for six dosages, then every three months; (ii) every three weeks; (iii) 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of about 1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and in some methods about 25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5 A "therapeutically effective dosage" of an anti-LAG-3 antibody of the invention preferably results in a decrease in severity of disease symptoms, an increase in frequency and duration of disease symptom-free periods, or a prevention of impairment or disability due to the disease affliction. For example, for the treatment of tumor-bearing subjects, a "therapeutically effective dosage" preferably inhibits tumor growth
10 by at least about 20%, more preferably by at least about 40%, even more preferably by at least about 60%, and still more preferably by at least about 80% relative to untreated subjects. A therapeutically effective amount of a therapeutic compound can decrease tumor size, or otherwise ameliorate symptoms in a subject, which is typically a human or can be another mammal.

15 The pharmaceutical composition can be a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. *See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed.,
20 Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Therapeutic compositions can be administered via medical devices such as (1) needleless hypodermic injection devices (*e.g.*, US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; and 4,596,556); (2) micro-infusion pumps (US 4,487,603); (3) transdermal devices (US 4,486,194); (4) infusion apparatus (US 4,447,233
25 and 4,447,224); and (5) osmotic devices (US 4,439,196 and 4,475,196); the disclosures of which are incorporated herein by reference.

In certain embodiments, the human monoclonal antibodies of the invention can be formulated to ensure proper distribution *in vivo*. For example, to ensure that the therapeutic compounds of the invention cross the blood-brain barrier, they can be
30 formulated in liposomes, which may additionally comprise targeting moieties to enhance selective transport to specific cells or organs. *See, e.g.* US 4,522,811; 5,374,548; 5,416,016; and 5,399,331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman *et al.* (1995) *FEBS*

Lett. 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; and Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

5

Uses and Methods of the Invention

The antibodies, antibody compositions and methods of the present invention have numerous *in vitro* and *in vivo* utilities involving, for example, detection of LAG-3 or enhancement of immune response by blockade of LAG-3. In a preferred
 10 embodiment, the antibodies of the present invention are human antibodies. For example, these molecules can be administered to cells in culture, *in vitro* or *ex vivo*, or to human subjects, *e.g.*, *in vivo*, to enhance immunity in a variety of situations. Accordingly, in one aspect, the invention provides a method of modifying an immune response in a subject comprising administering to the subject the antibody, or antigen-binding portion
 15 thereof, of the invention such that the immune response in the subject is modified. Preferably, the response is enhanced, stimulated or up-regulated.

Preferred subjects include human patients in need of enhancement of an immune response. The methods are particularly suitable for treating human patients having a disorder that can be treated by augmenting an immune response (*e.g.*, the T-cell
 20 mediated immune response). In a particular embodiment, the methods are particularly suitable for treatment of cancer *in vivo*. To achieve antigen-specific enhancement of immunity, the anti-LAG-3 antibodies can be administered together with an antigen of interest or the antigen may already be present in the subject to be treated (*e.g.*, a tumor-bearing or virus-bearing subject). When antibodies to LAG-3 are administered together
 25 with another agent, the two can be administered in either order or simultaneously.

The invention further provides methods for detecting the presence of human LAG-3 antigen in a sample, or measuring the amount of human LAG-3 antigen, comprising contacting the sample, and a control sample, with a human monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, which specifically binds to human LAG-
 30 3, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and human LAG-3. The formation of a complex is then detected, wherein a difference complex formation between the sample compared to the control sample is indicative the presence of human LAG-3 antigen in the sample. Moreover, the

anti-LAG-3 antibodies of the invention can be used to purify human LAG-3 via immunoaffinity purification.

Given the ability of anti-LAG-3 antibodies of the invention to inhibit the binding of LAG-3 to MHC Class II molecules and to stimulate antigen-specific T cell responses, the invention also provides *in vitro* and *in vivo* methods of using the antibodies of the invention to stimulate, enhance or upregulate antigen-specific T cell responses. For example, the invention provides a method of stimulating an antigen-specific T cell response comprising contacting said T cell with the antibody of the invention such that an antigen-specific T cell response is stimulated. Any suitable indicator of an antigen-specific T cell response can be used to measure the antigen-specific T cell response. Non-limiting examples of such suitable indicators include increased T cell proliferation in the presence of the antibody and/or increase cytokine production in the presence of the antibody. In a preferred embodiment, interleukin-2 production by the antigen-specific T cell is stimulated.

The invention also provides a method of stimulating an immune response (*e.g.*, an antigen-specific T cell response) in a subject comprising administering an antibody of the invention to the subject such that an immune response (*e.g.*, an antigen-specific T cell response) in the subject is stimulated. In a preferred embodiment, the subject is a tumor-bearing subject and an immune response against the tumor is stimulated. In another preferred embodiment, the subject is a virus-bearing subject and an immune response against the virus is stimulated.

In another aspect, the invention provides a method for inhibiting growth of tumor cells in a subject comprising administering to the subject an antibody of the invention such that growth of the tumor is inhibited in the subject. In yet another aspect, the invention provides a method of treating viral infection in a subject comprising administering to the subject an antibody of the invention such that the viral infection is treated in the subject.

These and other methods of the invention are discussed in further detail below.

Cancer

Blockade of LAG-3 by antibodies can enhance the immune response to cancerous cells in the patient. In one aspect, the present invention relates to treatment of a subject *in vivo* using an anti-LAG-3 antibody such that growth of cancerous tumors is inhibited. An anti-LAG-3 antibody can be used alone to inhibit the growth of cancerous

tumors. Alternatively, an anti-LAG-3 antibody can be used in conjunction with other immunogenic agents, standard cancer treatments, or other antibodies, as described below.

Accordingly, in one embodiment, the invention provides a method of inhibiting
 5 growth of tumor cells in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an anti-LAG-3 antibody, or antigen-binding portion thereof. Preferably, the antibody is a human anti-LAG-3 antibody (such as any of the human anti-human LAG-3 antibodies described herein). Additionally or alternatively, the antibody can be a chimeric or humanized anti-LAG-3 antibody.

10 Preferred cancers whose growth may be inhibited using the antibodies of the invention include cancers typically responsive to immunotherapy. Non-limiting examples of preferred cancers for treatment include melanoma (*e.g.*, metastatic malignant melanoma), renal cancer (*e.g.* clear cell carcinoma), prostate cancer (*e.g.* hormone refractory prostate adenocarcinoma), breast cancer, colon cancer and lung
 15 cancer (*e.g.* non-small cell lung cancer). Additionally, the invention includes refractory or recurrent malignancies whose growth may be inhibited using the antibodies of the invention.

Examples of other cancers that can be treated using the methods of the invention include bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck,
 20 cutaneous or intraocular malignant melanoma, uterine cancer, ovarian cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, testicular cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, non-Hodgkin's lymphoma, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system,
 25 cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, chronic or acute leukemias including acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, solid tumors of childhood, lymphocytic lymphoma, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, carcinoma
 30 of the renal pelvis, neoplasm of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, tumor angiogenesis, spinal axis tumor, brain stem glioma, pituitary adenoma, Kaposi's sarcoma, epidermoid cancer, squamous cell cancer, T-cell lymphoma, environmentally induced cancers including those induced by asbestos, and

combinations of said cancers. The present invention is also useful for treatment of metastatic cancers, especially metastatic cancers that express PD-L1 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Optionally, antibodies to LAG-3 can be combined with an immunogenic agent,
 5 such as cancerous cells, purified tumor antigens (including recombinant proteins, peptides, and carbohydrate molecules), cells, and cells transfected with genes encoding immune stimulating cytokines (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Non-limiting examples of tumor vaccines that can be used include peptides of melanoma antigens, such as peptides of gp100, MAGE antigens, Trp-2, MART1 and/or tyrosinase, or tumor
 10 cells transfected to express the cytokine GM-CSF (discussed further below).

In humans, some tumors have been shown to be immunogenic such as melanomas. By raising the threshold of T cell activation by LAG-3 blockade, the tumor responses in the host can be activated.

LAG-3 blockade is likely to be more effective when combined with a
 15 vaccination protocol. Many experimental strategies for vaccination against tumors have been devised (*see* Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; *see also* Restifo, N. and Sznol, M., Cancer
 20 Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). In one of these strategies, a vaccine is prepared using autologous or allogeneic tumor cells. These cellular vaccines have been shown to be most effective when the tumor cells are transduced to express GM-CSF. GM-CSF has been shown to be a potent activator of antigen presentation for tumor vaccination
 25 (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

The study of gene expression and large scale gene expression patterns in various tumors has led to the definition of so called tumor specific antigens (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). In many cases, these tumor specific antigens are differentiation antigens expressed in the tumors and in the cell from which the tumor
 30 arose, for example melanocyte antigens gp100, MAGE antigens, and Trp-2. More importantly, many of these antigens can be shown to be the targets of tumor specific T cells found in the host. LAG-3 blockade can be used in conjunction with a collection of recombinant proteins and/or peptides expressed in a tumor in order to generate an

immune response to these proteins. These proteins are normally viewed by the immune system as self antigens and are therefore tolerant to them. The tumor antigen can include the protein telomerase, which is required for the synthesis of telomeres of chromosomes and which is expressed in more than 85% of human cancers and in only a limited number of somatic tissues (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). (These somatic tissues may be protected from immune attack by various means). Tumor antigen can also be "neo-antigens" expressed in cancer cells because of somatic mutations that alter protein sequence or create fusion proteins between two unrelated sequences (*i.e.*, bcr-abl in the Philadelphia chromosome), or idiotype from B cell tumors.

Other tumor vaccines can include the proteins from viruses implicated in human cancers such a Human Papilloma Viruses (HPV), Hepatitis Viruses (HBV and HCV) and Kaposi's Herpes Sarcoma Virus (KHSV). Another form of tumor specific antigen which can be used in conjunction with LAG-3 blockade is purified heat shock proteins (HSP) isolated from the tumor tissue itself. These heat shock proteins contain fragments of proteins from the tumor cells and these HSPs are highly efficient at delivery to antigen presenting cells for eliciting tumor immunity (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).

Dendritic cells (DC) are potent antigen presenting cells that can be used to prime antigen-specific responses. DC's can be produced *ex vivo* and loaded with various protein and peptide antigens as well as tumor cell extracts (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DCs can also be transduced by genetic means to express these tumor antigens as well. DCs have also been fused directly to tumor cells for the purposes of immunization (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). As a method of vaccination, DC immunization can be effectively combined with LAG-3 blockade to activate more potent anti-tumor responses.

LAG-3 blockade can also be combined with standard cancer treatments. LAG-3 blockade can be effectively combined with chemotherapeutic regimes. In these instances, it may be possible to reduce the dose of chemotherapeutic reagent administered (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). An example of such a combination is an anti-LAG-3 antibody in combination with decarbazine for the treatment of melanoma. Another example of such a combination is an anti-LAG-3 antibody in combination with interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma. The scientific rationale behind the combined use of LAG-3 blockade and chemotherapy is

that cell death, that is a consequence of the cytotoxic action of most chemotherapeutic compounds, should result in increased levels of tumor antigen in the antigen presentation pathway. Other combination therapies that may result in synergy with LAG-3 blockade through cell death are radiation, surgery, and hormone deprivation. Each of these
 5 protocols creates a source of tumor antigen in the host. Angiogenesis inhibitors can also be combined with LAG-3 blockade. Inhibition of angiogenesis leads to tumor cell death which may feed tumor antigen into host antigen presentation pathways.

LAG-3 blocking antibodies can also be used in combination with bispecific antibodies that target Fc α or Fc γ receptor-expressing effectors cells to tumor cells (*see*,
 10 *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 5,922,845 and 5,837,243). Bispecific antibodies can be used to target two separate antigens. For example anti-Fc receptor/anti tumor antigen (*e.g.*, Her-2/neu) bispecific antibodies have been used to target macrophages to sites of tumor. This targeting may more effectively activate tumor specific responses. The T cell arm of these responses would be augmented by the use of LAG-3 blockade. Alternatively,
 15 antigen may be delivered directly to DCs by the use of bispecific antibodies which bind to tumor antigen and a dendritic cell specific cell surface marker.

Tumors evade host immune surveillance by a large variety of mechanisms. Many of these mechanisms may be overcome by the inactivation of proteins which are expressed by the tumors and which are immunosuppressive. These include among
 20 others TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), and Fas ligand (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Antibodies to each of these entities can be used in combination with anti-LAG-3 to counteract the effects of the immunosuppressive agent and favor tumor immune responses by the host.

25 Other antibodies which activate host immune responsiveness can be used in combination with anti-LAG-3. These include molecules on the surface of dendritic cells which activate DC function and antigen presentation. Anti-CD40 antibodies are able to substitute effectively for T cell helper activity (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478) and can be used in conjunction with LAG-3 antibodies (Ito *et al.* (2000) *Immunobiology*
 30 201 (5) 527-40). Activating antibodies to T cell costimulatory molecules such as CTLA-4 (*e.g.*, US Patent No. 5,811,097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), and ICOS

(Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) may also provide for increased levels of T cell activation.

Bone marrow transplantation is currently being used to treat a variety of tumors of hematopoietic origin. While graft versus host disease is a consequence of this
 5 treatment, therapeutic benefit may be obtained from graft vs. tumor responses. LAG-3 blockade can be used to increase the effectiveness of the donor engrafted tumor specific T cells.

There are also several experimental treatment protocols that involve *ex vivo* activation and expansion of antigen specific T cells and adoptive transfer of these cells
 10 into recipients in order to stimulate antigen-specific T cells against tumor (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). These methods can also be used to activate T cell responses to infectious agents such as CMV. *Ex vivo* activation in the presence of anti-LAG-3 antibodies can increase the frequency and activity of the adoptively transferred T cells.

15 Infectious Diseases

Other methods of the invention are used to treat patients that have been exposed to particular toxins or pathogens. Accordingly, another aspect of the invention provides a method of treating an infectious disease in a subject comprising administering to the
 20 subject an anti-LAG-3 antibody, or antigen-binding portion thereof, such that the subject is treated for the infectious disease. Preferably, the antibody is a human anti-human LAG-3 antibody (such as any of the human anti-LAG-3 antibodies described herein). Additionally or alternatively, the antibody can be a chimeric or humanized antibody.

Similar to its application to tumors as discussed above, antibody mediated LAG-3 blockade can be used alone, or as an adjuvant, in combination with vaccines, to
 25 stimulate the immune response to pathogens, toxins, and self-antigens. Examples of pathogens for which this therapeutic approach can be particularly useful, include pathogens for which there is currently no effective vaccine, or pathogens for which conventional vaccines are less than completely effective. These include, but are not limited to HIV, Hepatitis (A, B, & C), Influenza, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania,
 30 Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa. LAG-3 blockade is particularly useful against established infections by agents such as HIV that present altered antigens over the course of the infections. These novel epitopes are recognized as foreign at the time

of anti-human LAG-3 administration, thus provoking a strong T cell response that is not dampened by negative signals through LAG-3.

Some examples of pathogenic viruses causing infections treatable by methods of the invention include HIV, hepatitis (A, B, or C), herpes virus (*e.g.*, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, and CMV, Epstein Barr virus), adenovirus, influenza virus, flaviviruses, echovirus, rhinovirus, coxsackie virus, coronavirus, respiratory syncytial virus, mumps virus, rotavirus, measles virus, rubella virus, parvovirus, vaccinia virus, HTLV virus, dengue virus, papillomavirus, molluscum virus, poliovirus, rabies virus, JC virus and arboviral encephalitis virus.

Some examples of pathogenic bacteria causing infections treatable by methods of the invention include chlamydia, rickettsial bacteria, mycobacteria, staphylococci, streptococci, pneumonococci, meningococci and gonococci, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, diphtheria, salmonella, bacilli, cholera, tetanus, botulism, anthrax, plague, leptospirosis, and Lyme disease bacteria.

Some examples of pathogenic fungi causing infections treatable by methods of the invention include Candida (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, *etc.*), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (*fumigatus*, *niger*, *etc.*), Genus Mucorales (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), Sporothrix *schenkii*, Blastomyces *dermatitidis*, Paracoccidioides *brasiliensis*, Coccidioides *immitis* and Histoplasma *capsulatum*.

Some examples of pathogenic parasites causing infections treatable by methods of the invention include Entamoeba *histolytica*, Balantidium *coli*, Naegleria *fowleri*, Acanthamoeba *sp.*, Giardia *lamblia*, Cryptosporidium *sp.*, Pneumocystis *carinii*, Plasmodium *vivax*, Babesia *microti*, Trypanosoma *brucei*, Trypanosoma *cruzi*, Leishmania *donovani*, Toxoplasma *gondii*, Nippostrongylus *brasiliensis*.

In all of the above methods, LAG-3 blockade can be combined with other forms of immunotherapy such as cytokine treatment (*e.g.*, interferons, GM-CSF, G-CSF, IL-2), or bispecific antibody therapy, which provides for enhanced presentation of tumor antigens (*see, e.g.*, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

30 Autoimmune reactions

Anti-LAG-3 antibodies may provoke and amplify autoimmune responses. Indeed, induction of anti-tumor responses using tumor cell and peptide vaccines reveals that many anti-tumor responses involve anti-self reactivities (van Elsas *et al.* (2001) *J.*

Exp. Med. 194:481-489; Overwijk, *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) *supra*; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Therefore, it is possible to consider using anti-LAG-3 blockade in conjunction with various self proteins in order to devise vaccination

5 protocols to efficiently generate immune responses against these self proteins for disease treatment. For example, Alzheimer's disease involves inappropriate accumulation of A β peptide in amyloid deposits in the brain; antibody responses against amyloid are able to clear these amyloid deposits (Schenk *et al.*, (1999) *Nature* 400: 173-177).

Other self proteins can also be used as targets such as IgE for the treatment of

10 allergy and asthma, and TNF α for rheumatoid arthritis. Finally, antibody responses to various hormones may be induced by the use of anti-LAG-3 antibody. Neutralizing antibody responses to reproductive hormones can be used for contraception. Neutralizing antibody response to hormones and other soluble factors that are required for the growth of particular tumors can also be considered as possible vaccination

15 targets.

Analogous methods as described above for the use of anti-LAG-3 antibody can be used for induction of therapeutic autoimmune responses to treat patients having an inappropriate accumulation of other self-antigens, such as amyloid deposits, including A β in Alzheimer's disease, cytokines such as TNF α , and IgE.

20 Vaccines

Anti-LAG-3 antibodies can be used to stimulate antigen-specific immune responses by coadministration of an anti-LAG-3 antibody with an antigen of interest (*e.g.*, a vaccine). Accordingly, in another aspect the invention provides a method of enhancing an immune response to an antigen in a subject, comprising administering to

25 the subject: (i) the antigen; and (ii) an anti-LAG-3 antibody, or antigen-binding portion thereof, such that an immune response to the antigen in the subject is enhanced. Preferably, the antibody is a human anti-human LAG-3 antibody (such as any of the human anti-LAG-3 antibodies described herein). Additionally or alternatively, the antibody can be a chimeric or humanized antibody. The antigen can be, for example, a

30 tumor antigen, a viral antigen, a bacterial antigen or an antigen from a pathogen. Non-limiting examples of such antigens include those discussed in the sections above, such as the tumor antigens (or tumor vaccines) discussed above, or antigens from the viruses, bacteria or other pathogens described above.

Suitable routes of administering the antibody compositions (*e.g.*, human monoclonal antibodies, multispecific and bispecific molecules and immunoconjugates) of the invention *in vivo* and *in vitro* are well known in the art and can be selected by those of ordinary skill. For example, the antibody compositions can be administered by
5 injection (*e.g.*, intravenous or subcutaneous). Suitable dosages of the molecules used will depend on the age and weight of the subject and the concentration and/or formulation of the antibody composition.

As previously described, human anti-LAG-3 antibodies of the invention can be co-administered with one or other more therapeutic agents, *e.g.*, a cytotoxic agent, a
10 radiotoxic agent or an immunosuppressive agent. The antibody can be linked to the agent (as an immuno-complex) or can be administered separate from the agent. In the latter case (separate administration), the antibody can be administered before, after or concurrently with the agent or can be co-administered with other known therapies, *e.g.*, an anti-cancer therapy, *e.g.*, radiation. Such therapeutic agents include, among others,
15 anti-neoplastic agents such as doxorubicin (adriamycin), cisplatin bleomycin sulfate, carmustine, chlorambucil, dacarbazine and cyclophosphamide hydroxyurea which, by themselves, are only effective at levels which are toxic or subtoxic to a patient. Cisplatin is intravenously administered as a 100 mg/ml dose once every four weeks and adriamycin is intravenously administered as a 60-75 mg/ml dose once every 21 days.
20 Co-administration of the human anti-LAG-3 antibodies, or antigen binding fragments thereof, of the present invention with chemotherapeutic agents provides two anti-cancer agents which operate via different mechanisms which yield a cytotoxic effect to human tumor cells. Such co-administration can solve problems due to development of resistance to drugs or a change in the antigenicity of the tumor cells which would render
25 them unreactive with the antibody.

Also within the scope of the present invention are kits comprising the antibody compositions of the invention (*e.g.*, human antibodies, bispecific or multispecific molecules, or immunoconjugates) and instructions for use. The kit can further contain at least one additional reagent, or one or more additional human antibodies of the invention
30 (*e.g.*, a human antibody having a complementary activity which binds to an epitope in LAG-3 antigen distinct from the first human antibody). Kits typically include a label indicating the intended use of the contents of the kit. The term label includes any

writing, or recorded material supplied on or with the kit, or which otherwise accompanies the kit.

Combination therapy

In another aspect, the invention provides methods of combination therapy in which an anti-LAG-3 antibody is coadministered with one or more additional antibodies that are effective in stimulating immune responses to thereby further enhance, stimulate or upregulate immune responses in a subject. For example, the invention provides a method for stimulating an immune response in a subject comprising administering to the subject an anti-LAG-3 antibody and one or more additional immunostimulatory antibodies, such as an anti-PD-1 antibody, an anti-PD-L1 antibody and/or an anti-CTLA-4 antibody, such that an immune response is stimulated in the subject, for example to inhibit tumor growth or to stimulate an anti-viral response. In one embodiment, the subject is administered an anti-LAG-3 antibody and an anti-PD-1 antibody. In another embodiment, the subject is administered an anti-LAG-3 antibody and an anti-PD-L1 antibody. In yet another embodiment, the subject is administered an anti-LAG-3 antibody and an anti-CTLA-4 antibody. In one embodiment, the anti-LAG-3 antibody is a human antibody, such as an antibody of the disclosure. Alternatively, the anti-LAG-3 antibody can be, for example, a chimeric or humanized antibody (*e.g.*, prepared from a mouse anti-LAG-3 mAb). In another embodiment, the at least one additional immunostimulatory antibody (*e.g.*, anti-PD-1, anti-PD-L1 and/or anti-CTLA-4 antibody) is a human antibody. Alternatively, the at least one additional immunostimulatory antibody can be, for example, a chimeric or humanized antibody (*e.g.*, prepared from a mouse anti-PD-1, anti-PD-L1 and/or anti-CTLA-4 antibody).

In one embodiment, the present invention provides a method for treating a hyperproliferative disease (*e.g.*, cancer), comprising administering a LAG-3 antibody and a CTLA-4 antibody to a subject. In further embodiments, the anti-LAG-3 antibody is administered at a subtherapeutic dose, the anti-CTLA-4 antibody is administered at a subtherapeutic dose, or both are administered at a subtherapeutic dose. In another embodiment, the present invention provides a method for altering an adverse event associated with treatment of a hyperproliferative disease with an immunostimulatory agent, comprising administering an anti-LAG-3 antibody and a subtherapeutic dose of anti-CTLA-4 antibody to a subject. In certain embodiments, the subject is human. In certain embodiments, the anti-CTLA-4 antibody is human sequence monoclonal

antibody 10D1 (described in PCT Publication WO 01/14424) and the anti-LAG-3 antibody is human sequence monoclonal antibody, such as 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5 described herein. Other anti-CTLA-4 antibodies encompassed by the methods of the present invention include, for example, those disclosed in: WO

5 98/42752; WO 00/37504; U.S. Patent No. 6,207,156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); and Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. In certain embodiments, the anti-CTLA-4 antibody binds to human CTLA-4 with a K_D of 5×10^{-8} M or less, binds to human CTLA-4 with a K_D of 1×10^{-8}

10 M or less, binds to human CTLA-4 with a K_D of 5×10^{-9} M or less, or binds to human CTLA-4 with a K_D of between 1×10^{-8} M and 1×10^{-10} M or less.

In one embodiment, the present invention provides a method for treating a hyperproliferative disease (*e.g.*, cancer), comprising administering a LAG-3 antibody and a PD-1 antibody to a subject. In further embodiments, the anti-LAG-3 antibody is

15 administered at a subtherapeutic dose, the anti-PD-1 antibody is administered at a subtherapeutic dose, or both are administered at a subtherapeutic dose. In another embodiment, the present invention provides a method for altering an adverse event associated with treatment of a hyperproliferative disease with an immunostimulatory agent, comprising administering an anti-LAG-3 antibody and a subtherapeutic dose of

20 anti-PD-1 antibody to a subject. In certain embodiments, the subject is human. In certain embodiments, the anti-PD-1 antibody is a human sequence monoclonal antibody and the anti-LAG-3 antibody is human sequence monoclonal antibody, such as 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5 described herein. Examples of human sequence anti-PD-1 antibodies include 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 and 4A11, which are described in PCT

25 Publication WO 06/121168. In certain embodiments, the anti-PD-1 antibody binds to human PD-1 with a K_D of 5×10^{-8} M or less, binds to human PD-1 with a K_D of 1×10^{-8} M or less, binds to human PD-1 with a K_D of 5×10^{-9} M or less, or binds to human PD-1 with a K_D of between 1×10^{-8} M and 1×10^{-10} M or less.

In one embodiment, the present invention provides a method for treating a

30 hyperproliferative disease (*e.g.*, cancer), comprising administering a LAG-3 antibody and a PD-L1 antibody to a subject. In further embodiments, the anti-LAG-3 antibody is administered at a subtherapeutic dose, the anti-PD-L1 antibody is administered at a subtherapeutic dose, or both are administered at a subtherapeutic dose. In another

embodiment, the present invention provides a method for altering an adverse event associated with treatment of a hyperproliferative disease with an immunostimulatory agent, comprising administering an anti-LAG-3 antibody and a subtherapeutic dose of anti-PD-L1 antibody to a subject. In certain embodiments, the subject is human. In
 5 certain embodiments, the anti-PD-L1 antibody is a human sequence monoclonal antibody and the anti-LAG-3 antibody is human sequence monoclonal antibody, such as 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 or 17E5 described herein. Examples of human sequence anti-PD-L1 antibodies include 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 and 13G4, which are described in PCT Publication WO 07/005874. In certain
 10 embodiments, the anti-PD-L1 antibody binds to human PD-L1 with a K_D of 5×10^{-8} M or less, binds to human PD-L1 with a K_D of 1×10^{-8} M or less, binds to human PD-L1 with a K_D of 5×10^{-9} M or less, or binds to human PD-L1 with a K_D of between 1×10^{-8} M and 1×10^{-10} M or less.

Blockade of LAG-3 and one or more second target antigens such as CTLA-4
 15 and/or PD-1 and/or PD-L1 by antibodies can enhance the immune response to cancerous cells in the patient. Cancers whose growth may be inhibited using the antibodies of the instant disclosure include cancers typically responsive to immunotherapy. Representative examples of cancers for treatment with the combination therapy of the instant disclosure include those cancers specifically listed above in the discussion of
 20 monotherapy with anti-LAG-3 antibodies.

In certain embodiments, the combination of therapeutic antibodies discussed herein can be administered concurrently as a single composition in a pharmaceutically acceptable carrier, or concurrently as separate compositions with each antibody in a pharmaceutically acceptable carrier. In another embodiment, the combination of
 25 therapeutic antibodies can be administered sequentially. For example, an anti-CTLA-4 antibody and an anti-LAG-3 antibody can be administered sequentially, such as anti-CTLA-4 antibody being administered first and anti-LAG-3 antibody second, or anti-LAG-3 antibody being administered first and anti-CTLA-4 antibody second. Additionally or alternatively, an anti-PD-1 antibody and an anti-LAG-3 antibody can be
 30 administered sequentially, such as anti-PD-1 antibody being administered first and anti-LAG-3 antibody second, or anti-LAG-3 antibody being administered first and anti-PD-1 antibody second. Additionally or alternatively, an anti-PD-L1 antibody and an anti-LAG-3 antibody can be administered sequentially, such as anti-PD-L1 antibody being

administered first and anti-LAG-3 antibody second, or anti-LAG-3 antibody being administered first and anti-PD-L1 antibody second.

Furthermore, if more than one dose of the combination therapy is administered sequentially, the order of the sequential administration can be reversed or kept in the same order at each time point of administration, sequential administrations can be combined with concurrent administrations, or any combination thereof. For example, the first administration of a combination anti-CTLA-4 antibody and anti-LAG-3 antibody can be concurrent, the second administration can be sequential with anti-CTLA-4 first and anti-LAG-3 second, and the third administration can be sequential with anti-LAG-3 first and anti-CTLA-4 second, *etc.* Additionally or alternatively, the first administration of a combination anti-PD-1 antibody and anti-LAG-3 antibody can be concurrent, the second administration can be sequential with anti-PD-1 first and anti-LAG-3 second, and the third administration can be sequential with anti-LAG-3 first and anti-PD-1 second, *etc.* Additionally or alternatively, the first administration of a combination anti-PD-L1 antibody and anti-LAG-3 antibody can be concurrent, the second administration can be sequential with anti-PD-L1 first and anti-LAG-3 second, and the third administration can be sequential with anti-LAG-3 first and anti-PD-L1 second, *etc.* Another representative dosing scheme can involve a first administration that is sequential with anti-LAG-3 first and anti-CTLA-4 (and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1) second, and subsequent administrations may be concurrent.

Optionally, the combination of anti-LAG-3 and one or more additional antibodies (*e.g.*, anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibodies) can be further combined with an immunogenic agent, such as cancerous cells, purified tumor antigens (including recombinant proteins, peptides, and carbohydrate molecules), cells, and cells transfected with genes encoding immune stimulating cytokines (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Non-limiting examples of tumor vaccines that can be used include peptides of melanoma antigens, such as peptides of gp100, MAGE antigens, Trp-2, MART1 and/or tyrosinase, or tumor cells transfected to express the cytokine GM-CSF (discussed further below). A combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade can be further combined with a vaccination protocol, such as any of the vaccination protocols discussed in detail above with respect to monotherapy with anti-LAG-3 antibodies.

A combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade can also be further combined with standard cancer treatments. For example, a combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade can be effectively combined with chemotherapeutic regimes. In these instances, it is possible to reduce the dose of other
 5 chemotherapeutic reagent administered with the combination of the instant disclosure (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). An example of such a combination is a combination of anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 antibodies and/or anti-PD-1 antibodies and/or anti-PD-L1 antibodies further in combination with decarbazine for the treatment of melanoma. Another example is a combination of anti-LAG-3 and
 10 anti-CTLA-4 antibodies and/or anti-PD-1 antibodies and/or anti-PD-L1 antibodies further in combination with interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma. The scientific rationale behind the combined use of LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade with chemotherapy is that cell death, which is a consequence of the cytotoxic action of most chemotherapeutic compounds, should result in increased levels
 15 of tumor antigen in the antigen presentation pathway. Other combination therapies that may result in synergy with a combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade through cell death include radiation, surgery, or hormone deprivation. Each of these protocols creates a source of tumor antigen in the host. Angiogenesis inhibitors can also be combined with a combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1
 20 blockade. Inhibition of angiogenesis leads to tumor cell death, which can be a source of tumor antigen fed into host antigen presentation pathways.

A combination of LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blocking antibodies can also be used in combination with bispecific antibodies that target Fc α or Fc γ receptor-expressing effector cells to tumor cells (*see, e.g.*, U.S. Pat. Nos. 5,922,845
 25 and 5,837,243). Bispecific antibodies can be used to target two separate antigens. The T cell arm of these responses would be augmented by the use of a combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade.

In another example, a combination of anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 antibodies and/or anti-PD-L1 antibodies can be used in conjunction with anti-
 30 neoplastic antibodies, such as Rituxan[®] (rituximab), Herceptin[®] (trastuzumab), Bexxar[®] (tositumomab), Zevalin[®] (ibritumomab), Campath[®] (alemtuzumab), Lymphocide[®] (eprtezumab), Avastin[®] (bevacizumab), and Tarceva[®] (erlotinib), and the like. By way of example and not wishing to be bound by theory, treatment with an anti-cancer

antibody or an anti-cancer antibody conjugated to a toxin can lead to cancer cell death (e.g., tumor cells) which would potentiate an immune response mediated by CTLA-4, PD-1, PD-L1 or LAG-3. In an exemplary embodiment, a treatment of a hyperproliferative disease (e.g., a cancer tumor) can include an anti-cancer antibody in combination with anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibodies, concurrently or sequentially or any combination thereof, which can potentiate an anti-tumor immune responses by the host.

Tumors evade host immune surveillance by a large variety of mechanisms. Many of these mechanisms may be overcome by the inactivation of proteins, which are expressed by the tumors and which are immunosuppressive. These include, among others, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), and Fas ligand (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). In another example, antibodies to each of these entities can be further combined with an anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibody combination to counteract the effects of immunosuppressive agents and favor anti-tumor immune responses by the host.

Other antibodies that can be used to activate host immune responsiveness can be further used in combination with an anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibody combination. These include molecules on the surface of dendritic cells that activate DC function and antigen presentation. Anti-CD40 antibodies (Ridge *et al.*, *supra*) can be used in conjunction with an anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 combination (Ito *et al.*, *supra*). Other activating antibodies to T cell costimulatory molecules Weinberg *et al.*, *supra*, Melero *et al.* *supra*, Hutloff *et al.*, *supra*) may also provide for increased levels of T cell activation.

As discussed above, bone marrow transplantation is currently being used to treat a variety of tumors of hematopoietic origin. A combined LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade can be used to increase the effectiveness of the donor engrafted tumor specific T cells.

Several experimental treatment protocols involve *ex vivo* activation and expansion of antigen specific T cells and adoptive transfer of these cells into recipients in order to antigen-specific T cells against tumor (Greenberg & Riddell, *supra*). These methods can also be used to activate T cell responses to infectious agents such as CMV. *Ex vivo* activation in the presence of anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1

and/or anti-PD-L1 antibodies can be expected to increase the frequency and activity of the adoptively transferred T cells.

In certain embodiments, the present invention provides a method for altering an adverse event associated with treatment of a hyperproliferative disease (*e.g.*, cancer) with an immunostimulatory agent, comprising administering a anti-LAG-3 antibody and a subtherapeutic dose of anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibody to a subject. For example, the methods of the present invention provide for a method of reducing the incidence of immunostimulatory therapeutic antibody-induced colitis or diarrhea by administering a non-absorbable steroid to the patient. Because any patient who will receive an immunostimulatory therapeutic antibody is at risk for developing colitis or diarrhea induced by such an antibody, this entire patient population is suitable for therapy according to the methods of the present invention. Although steroids have been administered to treat inflammatory bowel disease (IBD) and prevent exacerbations of IBD, they have not been used to prevent (decrease the incidence of) IBD in patients who have not been diagnosed with IBD. The significant side effects associated with steroids, even non-absorbable steroids, have discouraged prophylactic use.

In further embodiments, a combination LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade (*i.e.*, immunostimulatory therapeutic antibodies anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 antibodies and/or anti-PD-L1 antibodies) can be further combined with the use of any non-absorbable steroid. As used herein, a "non-absorbable steroid" is a glucocorticoid that exhibits extensive first pass metabolism such that, following metabolism in the liver, the bioavailability of the steroid is low, *i.e.*, less than about 20%. In one embodiment of the invention, the non-absorbable steroid is budesonide. Budesonide is a locally-acting glucocorticosteroid, which is extensively metabolized, primarily by the liver, following oral administration. ENTOCORT EC[®] (Astra-Zeneca) is a pH- and time-dependent oral formulation of budesonide developed to optimize drug delivery to the ileum and throughout the colon. ENTOCORT EC[®] is approved in the U.S. for the treatment of mild to moderate Crohn's disease involving the ileum and/or ascending colon. The usual oral dosage of ENTOCORT EC[®] for the treatment of Crohn's disease is 6 to 9 mg/day. ENTOCORT EC[®] is released in the intestines before being absorbed and retained in the gut mucosa. Once it passes through the gut mucosa target tissue, ENTOCORT EC[®] is extensively metabolized by the cytochrome P450 system in the liver to metabolites with negligible glucocorticoid

activity. Therefore, the bioavailability is low (about 10%). The low bioavailability of budesonide results in an improved therapeutic ratio compared to other glucocorticoids with less extensive first-pass metabolism. Budesonide results in fewer adverse effects, including less hypothalamic-pituitary suppression, than systemically-acting
 5 corticosteroids. However, chronic administration of ENTOCORT EC[®] can result in systemic glucocorticoid effects such as hypercorticism and adrenal suppression. *See* PDR 58th ed. 2004; 608-610.

In still further embodiments, a combination LAG-3 and CTLA-4 and/or PD-1 and/or PD-L1 blockade (*i.e.*, immunostimulatory therapeutic antibodies anti-LAG-3 and
 10 anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibodies) in conjunction with a non-absorbable steroid can be further combined with a salicylate. Salicylates include 5-ASA agents such as, for example: sulfasalazine (AZULFIDINE[®], Pharmacia & UpJohn); olsalazine (DIPENTUM[®], Pharmacia & UpJohn); balsalazide (COLAZAL[®], Salix Pharmaceuticals, Inc.); and mesalamine (ASACOL[®], Procter & Gamble
 15 Pharmaceuticals; PENTASA[®], Shire US; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Solvay).

In accordance with the methods of the present invention, a salicylate administered in combination with anti-LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibodies and a non-absorbable steroid can includes any overlapping or
 20 sequential administration of the salicylate and the non-absorbable steroid for the purpose of decreasing the incidence of colitis induced by the immunostimulatory antibodies. Thus, for example, methods for reducing the incidence of colitis induced by the immunostimulatory antibodies according to the present invention encompass administering a salicylate and a non-absorbable concurrently or sequentially (*e.g.*, a
 25 salicylate is administered 6 hours after a non-absorbable steroid), or any combination thereof. Further, according to the present invention, a salicylate and a non-absorbable steroid can be administered by the same route (*e.g.*, both are administered orally) or by different routes (*e.g.*, a salicylate is administered orally and a non-absorbable steroid is administered rectally), which may differ from the route(s) used to administer the anti-
 30 LAG-3 and anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 antibodies.

The present disclosure is further illustrated by the following examples, which should not be construed as further limiting. The contents of all figures and all references, Genbank sequences, patents and published patent applications cited

throughout this application are expressly incorporated herein by reference. In particular, the disclosures of PCT publications WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, and WO 09/054863 are expressly incorporated herein by reference.

Example 1: Generation of Human Monoclonal Antibodies Against LAG-3

5 Anti-LAG-3 human monoclonal antibodies were generated using transgenic mice that express human antibody genes, as follows.

Antigens

Recombinant human LAG-3 fusion proteins were used as the immunogen to raise anti-human LAG-3 antibodies. In certain immunizations, a fusion protein
10 comprising the entire extracellular region (domains 1-4) of human LAG-3 fused to a human immunoglobulin Fc domain (R&D Systems, Catalog #2319-L3) (D1-D4 hFc) or a mouse immunoglobulin Fc domain (D1-D4 mFc) was used as the immunogen. For other immunizations, a fusion protein comprising only the first two extracellular domains of human LAG-3 fused to a mouse immunoglobulin Fc domain (D1-D2 mFc)
15 was used as the immunogen. The LAG-3 fusion proteins were prepared using standard recombinant DNA techniques.

Transgenic Transchromosomal KM MouseTM and KM/FCGR2D MouseTM

Strains

Fully human monoclonal antibodies to human LAG-3 were prepared using mice
20 of the transgenic transchromosomal KM MouseTM and KM/FCGR2D MouseTM strains, which expresses human antibody genes.

In the KM MouseTM strain, the endogenous mouse kappa light chain gene has been homozygously disrupted as described in Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:811-820 and the endogenous mouse heavy chain gene has been homozygously disrupted as
25 described in Example 1 of PCT Publication WO 01/09187. Furthermore, this mouse strain carries a human kappa light chain transgene, KCo5, as described in Fishwild *et al.*, *supra*. The strain also contains the SC20 transchromosome, which carries the human Ig heavy chain locus, as described in PCT Publication WO 02/43478. The KM/FCGR2D MouseTM strain is the same as the KM MouseTM strain except that its genome also
30 comprises a homozygous disruption of the endogenous FcγRIIB gene. The KM MouseTM and KM/FCGR2D MouseTM strains are also described in detail in U.S. Application Publication No. 20020199213.

KM MouseTM and KM/FCGR2D MouseTM Immunizations:

To generate fully human monoclonal antibodies to LAG-3, mice of the KM MouseTM and KM/FCGR2D MouseTM strains were immunized with one of the three different recombinant LAG-3 fusion protein described above (D1-D4 hFc, D1-D4 mFc, D1-D2, mFc). General immunization schemes are described in Lonberg *et al.* (1994) *supra*; Fishwild *et al.*, *supra* and PCT Publication WO 98/24884. The mice were 6-16 weeks of age upon the first infusion of antigen. Mice were immunized intraperitoneally (IP) and/or subcutaneously (SC). The mice were immunized biweekly four times with 10 µg of the recombinant LAG-3 fusion protein, followed by immunization twice with 20 µg of the same immunogen in Ribi as an adjuvant. The immune response was monitored by retroorbital bleeds. The plasma was screened by ELISA (as described below), and mice with sufficient titers of anti-LAG-3 human immunoglobulin were used for fusions. Prior to sacrifice and removal of the spleens, the mice were boosted intravenously and intraperitoneally with 20 µg of antigen followed by a subsequent intravenous boost with 20 µg of antigen.

Selection of KM and KM/FCGR2D Mice Producing Anti-LAG-3 Antibodies

To select mice producing antibodies that bound LAG-3 protein, sera from mice immunized with the D1-D4 hFc fusion protein were tested by a modified ELISA as originally described by Fishwild *et al.* (1996). Briefly, microtiter plates were coated with purified recombinant LAG-3 fusion protein at 1 µg/ml in PBS, 50 µl/wells incubated 4°C overnight, then blocked with 200 µl/well of 5% BSA in PBS. Dilutions of plasma from LAG-3-immunized mice were added to each well and incubated for 1-2 hours at ambient temperature. The plates were washed with PBS/Tween and then incubated with a goat-anti-human kappa light chain polyclonal antibody conjugated with Horse Radish Peroxidase (HRP) for 1 hour at room temperature. After washing, the plates were developed with ABTS substrate and analyzed by spectrophotometer at OD 405.

For mice immunized with the D1-D4 mFc or D1-D2 mFc fusion proteins, sera from these mice were tested by indirect ELISA using goat anti-mouse IgG to coat the plates for one hour prior to coating with the antigen to eliminate nonspecific binding to the mouse Fc part. Then the same ELISA steps as described above were carried out.

Mice that developed the highest titers of anti-LAG-3 antibodies were used for fusions. Fusions were performed as described below and hybridoma supernatants were tested for anti-LAG-3 activity by ELISA.

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies to LAG-3

5 Proteins

The mouse splenocytes, isolated from the KM or KM/FCGR2D mice, were fused by electric field based electrofusion using a Cyto Pulse large chamber cull fusion electroporator (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) to a mouse myeloma cell line. The resulting hybridomas were then screened for the production of antigen-specific
 10 antibodies. Single cell suspensions of splenic lymphocytes from immunized mice were fused to one-fourth the number of P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) nonsecreting mouse myeloma cells. Cells were plated at approximately 1×10^5 /well in flat bottom microtiter plate, followed by about two week incubation in selective medium containing 10% fetal calf serum, supplemented with origen (IGEN) in RPMI, L-glutamine, sodium
 15 pyruvate, HEPES, penicillin, streptomycin, gentamycin, 1x HAT, and β -mercaptoethanol. After 1-2 weeks, cells were cultured in medium in which the HAT was replaced with HT. Individual wells were then screened by ELISA (described above) for human anti-LAG-3 monoclonal IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth occurred, medium was monitored usually after 10-14 days. The antibody
 20 secreting hybridomas were replated, screened again and, if still positive for human IgG, anti-LAG-3 monoclonal antibodies were subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones were then cultured *in vitro* to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for further characterization.

Hybridoma clones 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 were selected for
 25 further analysis and sequencing.

Example 2: Structural Characterization of Human Anti-LAG-3 Monoclonal Antibodies 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5

The cDNA sequences encoding the heavy and light chain variable regions of the mAbs expressed by the 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 clones, as described in
 30 Example 1, were sequenced using the following protocol. Total RNA was prepared from 5×10^6 hybridoma cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). cDNA was prepared by the 5'-RACE protocol with the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) and SuperScript II

Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). V-regions of each antibody were amplified using a 3' human-specific constant region primer, paired with the 5' RACE universal primer mix. PCR products containing the V-region were cloned into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and transformed into *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Either miniprep DNA or Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA) samples were prepared, and subjected to DNA sequencing (Sequetech, Mountain View, CA). The resultant DNA sequences were analyzed for in-frame rearrangements and other antibody characteristics. The expressed proteins were characterized by standard protein chemistry analysis. The 25E3, 25F7 and 26H10 clones were found to express an antibody comprising an IgG1 heavy chain and a kappa light chain, whereas the 8B7 and 17E5 clones were found to express an antibody comprising an IgG4 heavy chain and a kappa light chain and the 11F2 clone was found to express an antibody comprising an IgG2 heavy chain and a kappa light chain.

The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 25F7 are shown in Figure 1A and in SEQ ID NO: 49 and 37, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the kappa light chain variable region of 25F7 are shown in Figure 1B and in SEQ ID NO: 55 and 43, respectively. Comparison of the 25F7 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences (Figure 7) showed that the 25F7 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 4-34 (SEQ ID NO:61), and a JH segment from human germline JH5b (SEQ ID NO:62). Further analysis of the 25F7 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 1A and in SEQ ID NOs: 1, 7 and 13, respectively. Comparison of the 25F7 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences (Figure 8) showed that the 25F7 kappa light chain utilizes a V_K segment from human germline V_K L6 (SEQ ID NO:63) and a J_K segment from human germline JK 2 (SEQ ID NO:64). Further analysis of the 25F7 V_K sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 1B and in SEQ ID NOs: 19, 25 and 31, respectively.

The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 26H10 are shown in Figure 2A and in SEQ ID NO: 50 and 38, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 26H10 are

shown in Figure 2B and in SEQ ID NO: 56 and 44, respectively. Comparison of the 26H10 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences (Figure 9) showed that the 26H10 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 3-33 (SEQ ID NO:65), and a JH segment from human germline JH 6B (SEQ ID NO:66). Further analysis of the 26H10 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 2A and in SEQ ID NOs: 2, 8 and 14, respectively. Comparison of the 26H10 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences (Figure 10) showed that the 26H10 kappa light chain utilizes a V_k segment from human germline V_k A27 (SEQ ID NO:67) and a J_k segment from human germline JK 3 (SEQ ID NO:68). Further analysis of the 26H10 V_k sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 2B and in SEQ ID NOs: 20, 26 and 32, respectively.

The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 25E3 are shown in Figure 3A and in SEQ ID NO: 51 and 39, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 25E3 are shown in Figure 3B and in SEQ ID NO: 57 and 45, respectively. Comparison of the 25E3 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences (Figure 11) showed that the 25E3 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 3-20 (SEQ ID NO:69), and a JH segment from human germline JH 4b (SEQ ID NO:70). Further analysis of the 25E3 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 3A and in SEQ ID NOs: 3, 9 and GGY, respectively. Comparison of the 25E3 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences (Figure 12) showed that the 25E3 kappa light chain utilizes a V_k segment from human germline V_k L18 (SEQ ID NO:71) and a J_k segment from human germline JK 2 (SEQ ID NO:64). Further analysis of the 25E3 V_k sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 3B and in SEQ ID NOs: 21, 27 and 33, respectively.

The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 8B7 are shown in Figure 4A and in SEQ ID NO: 52 and 40, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 8B7 are shown in Figure 4B and in SEQ ID NO: 58 and 46, respectively. Comparison of the 8B7 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences (Figure 13) showed that the 8B7 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 4-34 (SEQ ID NO:61), and a JH segment from human germline JH 5B (SEQ ID NO:62). Further analysis of the 8B7 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 4A and in SEQ ID NOs: 4, 10 and 16, respectively. Comparison of the 8B7 light chain immunoglobulin sequence (Figure 14) to the known human germline immunoglobulin light chain sequences showed that the 8B7 kappa light chain utilizes a V_K segment from human germline V_K L6 (SEQ ID NO:63) and a J_K segment from human germline JK 4 (SEQ ID NO:72). Further analysis of the 26H10 V_K sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 4B and in SEQ ID NOs: 22, 28 & 34, respectively.

The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 11F2 are shown in Figure 5A and in SEQ ID NO: 53 and 41, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 11F2 are shown in Figure 5B and in SEQ ID NO: 59 and 47, respectively. Comparison of the 11F2 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences (Figure 15) showed that the 11F2 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 1-24 (SEQ ID NO:73), a D segment from the human germline 2-15, and a JH segment from human germline JH 4B (SEQ ID NO:70). Further analysis of the 11F2 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 13A and in SEQ ID NOs: 5, 11 and 17, respectively. Comparison of the 11F2 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences (Figure 16) showed that the 11F2 kappa light chain utilizes a V_K segment from human germline V_K L6 (SEQ ID NO:63) and a J_K segment from human germline JK 1 (SEQ ID NO:74). Further analysis of the 11F2 V_K sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of

the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 5B and in SEQ ID NOs: 23, 29 and 35, respectively.

The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 17E5 are shown in Figure 6A and in SEQ ID NO: 54 and 42, respectively. The
 5 nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 17E5 are shown in Figure 6B and in SEQ ID NO: 60 and 48, respectively. Comparison of the 17E5 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences (Figure 17) showed that the 17E5 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 3-33 (SEQ ID NO:65), a D segment
 10 from the human germline 2-2, and a JH segment from human germline JH 4B (SEQ ID NO:70). Further analysis of the 17E5 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 6A and in SEQ ID NOs: 6, 12 and 18, respectively. Comparison of the 17E5 light chain immunoglobulin sequence to the known human
 15 germline immunoglobulin light chain sequences (Figure 18) showed that the 17E5 kappa light chain utilizes a V_k segment from human germline V_k L6 (SEQ ID NO:63) and a J_k segment from human germline JK 5 (SEQ ID NO:75). Further analysis of the 17E5 V_k sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions as shown in Figure 6B and in SEQ ID
 20 NOs: 24, 30 and 36, respectively.

The 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 variable regions can be converted to full-length antibodies of any desired isotype using standard recombinant DNA techniques. For example, DNA encoding the V_H and V_L regions can be cloned into an expression vector that carries the heavy and light chain constant regions such that the
 25 variable regions are operatively linked to the constant regions. Alternatively, separate vectors can be used for expression of the full-length heavy chain and the full-length light chain. Non-limiting examples of expression vectors suitable for use in creating full-length antibodies include the pIE vectors described in U.S. Patent Publication No. 20050153394.

30 **Example 3: Characterization of Binding Properties of LAG-3 Monoclonal Antibodies**

In this example, the binding of human anti-LAG-3 antibodies to cell surface LAG-3 (human, monkey and mouse LAG-3) was examined by flow cytometry.

Furthermore, binding kinetics to LAG-3 were analyzed by BIACORE analysis. Still further epitope mapping was conducted using a peptide scan experiment.

A. Flow Cytometry Studies

1. CHO-human LAG-3 Cell Binding

5 To test the ability of the antibodies to bind to cell surface LAG-3 protein, the antibodies were incubated with a CHO cell line that had been transfected to express human LAG-3 on the cell surface. The 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 monoclonal antibodies were serially diluted with cold 1x PFAE buffer (1x PBS + 2% FBS, 0.02% sodium azide, 2mM Na EDTA). For the binding reaction, 50 µl of diluted
10 antibody solution was added to a 50 µl cell suspension containing 2 x 10⁵ cells and the mixture was incubated on ice for 30 minutes. The cells were then washed two times with 1x PFAE buffer. A 1:100 dilution of FITC-labeled goat anti-human kappa light chain antibody (Bethyl Laboratories, Inc., Cat. # A80-115F) was added and the mixture was incubated for 30 minutes at 4°C, followed by washing twice with cold 1x PFAE
15 buffer. After the final wash, 150 µl of cold 1x PFAE containing 10 µg/mL propidium iodide (Roche Applied Science, Cat #1_348_639) was added to each solution and analysis of antibody binding was carried out by flow cytometry using a FACScalibur flow cytometer (BD Bioscience).

 The results of the flow cytometry analysis are summarized below in Table 1,
20 which shows EC₅₀ for binding to CHO-human LAG-3, demonstrating that 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5 bind effectively to cell-surface human LAG-3, with 25F7 having approximately a 20 fold lower EC₅₀ than 25E3 but approximately equivalent EC₅₀ to that of 8B7 and 26H10. The EC₅₀ results for 11F2 and 17E5 were in the same range as for 25E3.

25 Table 1: Binding of Anti-LAG-3 Antibodies to CHO Cells Expressing Human LAG-3

<u>Antibody</u>	<u>EC₅₀ (nM)</u>
25F7	0.45 – 2.52
8B7	1.93 – 4.44
26H10	1.81 – 3.64
11F2	15.12
25E3	14.9 – 25.39
17E5	12.3

2. Activated human CD4⁺ T Cell Binding

To test the ability of the antibodies to bind to native human LAG-3 on the surface of activated human T cells, resting CD4⁺ T cells were isolated from purified peripheral blood mononuclear cells and subjected to three days of stimulation with a combination of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies affixed to polystyrene beads. The 25F7, 8B7 and 26H10 monoclonal antibodies were serially diluted with cold 1x PFAE buffer (1x PBS + 2% FBS, 0.02% sodium azide, 2mM Na EDTA). For the binding reaction, 50 µl of diluted antibody solution was mixed with 50 µl of PE-labeled anti-human CD4 (BD Bioscience, Cat # 555347). Activated T cells were processed by the same protocol described above. The analysis of antibody binding was conducted as described above.

The results of the flow cytometry analysis are summarized below in Table 2, which shows EC₅₀ for binding to activated human CD4⁺ T cells, demonstrating that all three antibodies bind similarly to cell-surface human LAG-3.

Table 2: Binding of Anti-LAG-3 Antibodies to Activated human CD4⁺ T cells

<u>Antibody</u>	<u>EC₅₀ (nM)</u>
25F7	0.27 – 0.45
26H10	0.41 – 0.84
8B7	0.69 – 1.80

3. Monkey LAG-3 Antigen Binding

To determine whether the anti-LAG-3 antibodies cross-react with monkey LAG-3, a cDNA sequence was cloned by RT-PCR from a preparation of pooled cDNA prepared by reverse transcription of RNAs from a collection of cynomolgus and rhesus monkey tissue samples. The sequence was first amplified from the cDNA pool using primers (5' forward primer: 5Mcyn1408; 5'-atgtgggaggctcagttcctg-3' (SEQ ID NO: 91) & 3' reverse primer: 3Mcyn1408a; 5'-gtcagagctgctccggctc-3' (SEQ ID NO: 92)) using a GC-rich PCR amplification system (Roche) and was cloned into a recipient TOPO cloning vector (Invitrogen) for sequence analysis. Clones matching the reference Genbank rhesus monkey LAG-3 sequence (Genbank Accession No. XM_001108923) were subsequently re-amplified from the TOPO-cloning vector DNA utilizing a second set of primers that incorporated restriction enzyme sites for directional cloning in a mammalian cell expression vector.

Monkey LAG-3 clone pa23-5 was isolated and sequenced. The isolated monkey sequence exhibited 99.6% identity to the reference Genbank rhesus monkey LAG-3 sequence. A comparison of the amino acid sequence of cDNA clone pa23-3 (SEQ ID NO: 93) with rhesus monkey LAG-3 (SEQ ID NO: 94) from Genbank (Accession No. XM_001108923) is shown in Figure 19. The two sequences are identical except for a one amino acid difference at position 419 (arginine in clone pa23-5 versus threonine in the Genbank rhesus sequence) and on this basis it is concluded that cDNA clone pa23-5 represents the rhesus LAG-3 gene sequence.

The cDNA of clone pa23-5 was inserted into an expression construct, which was transfected into CHO-S suspension cells by nucleofection (Amaxa). Rhesus LAG-3 expression by sorted, selection drug-resistant clones was verified by FACS analysis. This clonal CHO cell line over-expressing rhesus LAG-3 was used in similar FACS assays to those described above to measure antibody cross reactivity to the monkey protein. Briefly, the 25F7, 8B7 and 26H10 monoclonal antibodies were serially diluted with cold 1x PFAE buffer (1x PBS + 2% FBS, 0.02% sodium azide, 2mM Na EDTA). For the binding reaction, 50µl of diluted antibody solution was added to a 50 µl cell suspension containing 2×10^5 cells and the mixture was incubated on ice for 30 minutes. The cells were processed by the same protocol described above. The analysis of antibody binding was conducted as described above.

In a separate experiment, the antibodies were tested for binding to cynomolgus monkey LAG-3 using activated cynomolgus monkey T cells. *In vitro* activation of these monkey T cells was achieved through anti-CD3/anti-CD28 treatment of the T cells by essentially the same protocol described above for the *in vitro* activation of human T cells, followed by flow cytometry analysis performed as described above for staining of *in vitro* activated human CD4⁺ T cells.

The results of the flow cytometry analyses using the CHO-rhesus LAG-3 cells and the activated cynomolgus T cells are summarized below in Table 3, which shows EC₅₀ for binding to the two different types of cells expressing monkey LAG-3. These results showed that all antibodies bind effectively to both LAG-3 on the activated cynomolgus T cells and the rhesus LAG-3 (SEQ ID NO: 93) transfected into CHO cells. There is a hierarchy, however, of binding affinities, with clone 26H10 showing the highest affinity, which is approximately 2.5 and 6-fold better than that of clones 8B7 and 25F7, respectively. Difference in binding hierarchy between the two cell types may

reflect amino acid sequence differences between the rhesus and cynomolgus LAG-3 proteins.

Table 3: Binding of Anti-LAG-3 Antibodies to Monkey LAG-3

Antibody	Activated Cyno CD4 ⁺ T cells EC ₅₀ (nM)	CHO-rhesus LAG3 EC ₅₀ (nM)
26H10	5.19	4.684
25F7	14.18	22.72
8B7	30.45	10.01

5 4. Mouse LAG-3 Antigen Binding

To determine whether the antibodies cross-reacted with mouse LAG-3, similar flow cytometry studies to those described above were performed using as the target cell a mouse T cell hybridoma cell line (3A9) that had been transfected to express mouse LAG-3 on its cell surface, followed by FACS analysis to detect antibody binding. The results indicated that, in contrast to a control anti-mouse LAG3 control antibody which showed strong staining, none of the human antibodies 25E3, 25F7, 8B7 or 26H10 exhibited binding above background levels to cell surface mouse LAG-3, demonstrating that none of these antibodies cross-react with mouse LAG-3.

15 B. BIACORE Analysis

The binding of the 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 and 17E5 antibodies to recombinant LAG-3 protein was examined by BIAcore™ using a capture method. The 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 and 17E5 antibodies each were captured using anti-CH1, a reagent antibody that is specific towards the heavy chain constant region 1 of human antibody (Zymed, Clone HP6045, Stock conc. 1.0 mg/mL). Anti-CH1 was coated on a CM5 chip (BR-1000-14, Research Grade) at high density (9700-11500RUs). The coating was carried out based on the standard immobilization procedure recommended by the manufacturer. The 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 or 17E5 purified antibody, with concentrations ranging from 0.5-3 µg/mL, was then captured on the anti-CH1 coated surface at the flow-rate of 10uL/min for 1 minute. A single concentration of recombinant human LAG-3 fusion protein (20 nM) was injected over captured antibody for 3 minutes at a flow rate of 25 µg/mL. The antigen was allowed to dissociate for 7.5 minutes. The chip surface was regenerated after each cycle with 25 µL of 25 mM NaOH followed by 30 µL of HBS-EP wash. Isotype controls were run on the chip, and the data used to subtract non-specific binding. All the experiments were carried out on a Biacore 3000 surface plasmon resonance instrument, using BIAcore Control software v 3.2. Data analysis was carried

out using BiaEvaluation v3.2 software. The results are shown in Table 4 below. The BIAcore results for 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 and 17E5 confirm the flow cytometry results that all five antibodies are capable of binding with high affinity to human LAG-3.

Table 4: Binding Kinetics of Anti-LAG-3 Antibody to Recombinant Human LAG-3

<u>Antibody</u>	<u>K_D x 10⁻⁹ (M)</u>
25E3	0.09
8B7	0.09
26H10	0.10
25F7	0.47
17E5	4.53

5

C. Epitope Mapping

In the LAG-3 protein, the immunoglobulin-like first domain of the extracellular region contains an exposed "extra loop" having the amino acid sequence:

GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 79). To examine the

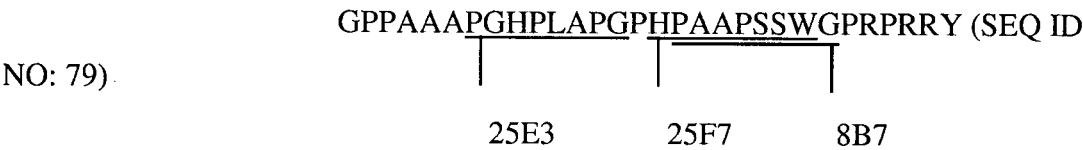
10 binding of 25E3, 25F7, 8B7 and 26H10 to this region of LAG-3, and map the epitope bound by each antibody, a peptide scan experiment was performed across this region. A series of 10 overlapping peptides that scanned across the full length of the extra loop sequence were prepared and conjugated to biotin. For ELISA analysis, microtiter plates pre-coated with streptavidin (Sigma-Aldrich, Cat # M5432) were used to capture the
15 biotinylated loop peptide-conjugates applied in a 100 µl volume at a concentration of 2 µg/mL and incubated 18 hours at 4°C, after which the plates were washed 3 times and blocked at room temperature for 1 hour with blocking buffer (1x PBS + 10% FBS). Next, human anti-LAG-3 antibodies serially diluted 3-fold in blocking buffer from 10 µg/mL were applied and the plates were incubated at room temperature for 2 hours and
20 then washed three times. To detect bound human antibody a HRP-conjugated goat anti-human kappa light chain antibody (Bethyl Laboratories, Cat #A80-115P) was diluted to 1 µg/mL in blocking buffer and applied to assay wells for 1 hour followed by three washes and application of TMB substrate (eBioscience, Cat #00-4201-56). Optical density readings at 650 nm wavelength were made on a Spectramax 340PC
25 spectrophotometer (Molecular Dynamics, Inc.). The results of the peptide scan experiment are summarized below in Table 5.

Table 5: Anti-LAG Antibody Binding to Peptide Scan of LAG-3 Extra Loop

LAG-3 Extra Loop Peptide Scan	SEQ				
GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY	79	25E3	8B7	25F7	26H10
GPPAAAPGHPLA	80	-	-	-	-
PAAAPGHPLAPG	81	++	-	-	-
AAPGHPLAPGPH	82	++	-	-	-
PGHPLAPGPHPA	83	+	-	-	-
HPLAPGPHPAAP	84	±	-	-	-
LAPGPHPAAPSS	85	-	-	-	-
PGPHPAAPSSWG	86	-	++	++	-
PHPAAPSSWGPR	87	-	++	++	-
PAAPSSWGPRPR	88	-	++	+	-
APSSWGPRPRRY	89	-	-	-	-

Based on these results, it was determined that the 25E3 antibody recognized a region within the extracellular loop comprising the amino acid sequence PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), whereas the 25F7 antibody recognized a region within the extra loop comprising the amino acid sequence HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77) and 8B7 appeared to recognize a region within the extracellular loop comprising the amino acid sequence PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). In contrast, no binding of the full length extra loop peptide or any of the shorter scanning peptides by the 26H10 antibody could be detected.

The regions identified in this study are underlined in the full-length extra loop sequence:



Thus, the peptide scan results indicate that the 25E3, 25F7 and 8B7 antibodies bind to different although closely located epitopes within human LAG-3.

To further examine binding of these antibodies to the extra loop peptide region, additional ELISA assays were performed. In an ELISA assay using the human full-length extra loop peptide (SEQ ID NO: 79), EC₅₀ values for binding were determined for 25E3, 25F7 and 8B7. Additionally, a similar peptide ELISA was conducted using the full length extra loop peptide sequence from rhesus monkey LAG-3, having the sequence GPPAPAPGHPPAPGHRPAAP YSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 90), and EC₅₀ values for binding were determined for 25F7 and 8B7. The results are summarized below in Table 6. The results confirm that antibodies 25E3, 25F7 and 8B7 are capable

of recognizing the human LAG-3 extra loop peptide region. Moreover, antibodies 25F7 and 8B7 also bind to the rhesus LAG-3 extra loop peptide region, albeit less well compared to the human sequence, which may be due to the species sequence divergence in this polypeptide. The results also confirm that the 26H10 antibody is not capable of recognizing the LAG-3 extra loop peptide.

Table 6: Binding of Anti-LAG-3 Antibodies to Human and Rhesus LAG-3 Extra Loop Peptide

Antibody	Human Extra Loop EC ₅₀ (nM)	Rhesus Extra Loop EC ₅₀ (nM)
25E3	0.55	Not tested
25F7	0.29-0.95	13.09
8B7	0.28-1.35	0.60
26H10	No binding	No binding

Example 4: Inhibition of Binding of LAG-3 to MHC Class II by Anti-LAG-3 mAbs

To test the ability of the anti-LAG-3 antibodies to inhibit binding of LAG-3 to MHC Class II molecules, an *in vitro* binding assay was performed in which a LAG-3 fusion protein, comprising human LAG-3 extracellular domain fused to mouse Fc (hLAG-3-mIg), was reacted with Daudi cells, which express human MHC Class II molecules.

To test antibody inhibition of LAG-3 binding to MHC Class II, 25E3, 25F7, 8B7 and 26H10 were serially diluted from 20 µg/mL in PFAE buffer and to these serial dilutions was added 1 µg/ml of hLAG-3-mIg fusion protein. This mixture was incubated for 20 minutes at room temperature prior to adding to 2x10⁵ 1x PFAE-washed Daudi cells. The mixture was applied to Daudi cells and incubated at 4°C for 30 minutes. The cells were pelleted (three minutes, 400 xg), washed once with 1x PFAE buffer and re-pelleted, and binding of hLAG-3-mIg to the Daudi cells was detected using a recombinant PE-labeled anti-mIgG Fcγ secondary reagent. Analysis of LAG-3-mIg binding was carried out with the FACScalibur flow cytometer (BD Bioscience). The results are summarized in Table 7 below, which shows IC₅₀ values in nM.

Table 7: Inhibition of LAG-3 Binding to MHC Class II by Anti-LAG-3 Antibodies

Antibody	IC ₅₀ (nM)
25E3	0.8 - 6.78
25F7	0.12 - 0.92
8B7	0.19 - 0.95
26H10	0.10

The results demonstrate that all four antibodies are effective in inhibiting binding of LAG-3 to MHC Class II antibodies, with 25F7, 8B7 and 26H10 exhibiting IC₅₀ values approximately 7 to 13-fold lower than that of 25E3.

5 **Example 5: Stimulation of Antigen-Specific T Cell Response by Anti-LAG-3 mAbs**

To test the ability of the anti-LAG-3 antibodies to stimulate an antigen-specific T cell response, a 3A9 T Cell Peptide Stimulation Assay (*see e.g.*, Workman *et al.* (2003) *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263) was used.

In this assay, a mouse T cell hybridoma, 3A9, specific for the peptide HEL₄₈₋₆₂, was used as the responder T cell. The responder 3A9 T cell was retrovirally transduced to express either human LAG-3 or mouse LAG-3 on its cell surface. The antigen presenting cell (APC) used to present the HEL₄₈₋₆₂ peptide antigen to the 3A9 cells was the mouse MHC Class II positive cell line LK35.2. Separate studies determined that a human LAG-3 fusion protein was capable of binding to mouse MHC Class II molecules, thereby validating the use of LK35.2 mouse APCs in this assay. Antigen-specific stimulation of the 3A9 cells was indicated by production of interleukin-2 (IL-2), the secretion of which was measured by ELISA (mouse IL-2 OptEIA kit, BD Bioscience, Cat #555148 according to manufacturer's recommendations).

Ectopic expression of human or mouse LAG-3 on the 3A9 T cells, in the absence of any antibodies, led to an inhibitory effect on antigen-specific responses when the transfected T cells were incubated with the LK35.2 APCs presenting the HEL₄₈₋₆₂ peptide antigen, as indicated by an increase in the amount of peptide antigen needed to stimulate IL-2 production by the 3A9 cells in comparison to the peptide dose response profile of control 3A9 T cells.

To test antibody stimulation of the antigen-specific T cell response, the APC (2.5x10⁴ cells) was first preincubated with the antigenic peptide (200 nM) for 30 minutes at 37°C and the 3A9 T cells (5.0x10⁴ cells expressing either mLAG-3, hLAG-3 or control cells) were preincubated with an anti-hLAG-3 antibody (25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2, 17E5), serially diluted in three fold dilution from 25 µg/mL) for 15 minutes at 37°C. The 3A9 T cells were then added to the antigen-pulsed APCs and the culture incubated for 24 hours at 37°C. The supernatants were then harvested and

measured for production of mouse IL-2. The results for the 3A9 T cells expressing human LAG-3 are in Table 8, which shows IC₅₀ values in nM.

Table 8: Stimulation of Antigen-Specific T Cell Responses by Anti-LAG-3

Antibodies

Antibody	3A9-hLAG-3 Peptide Assay IC ₅₀ (nM)
25F7	0.14 – 1.94
26H10	1.45 – 6.49
8B7	3.25 – 13.90
25E3	3.88 – 70.78
11F2	81.50 – 240
17E5	No inhibition

5 The results show that antibodies 25F7, 8B7 and 26H10, and to a lesser extent 25E3, were able to stimulate IL-2 production in an antigen-specific T cell response assay, whereas antibody 11F2 exhibited minimal ability to inhibit and antibody 17E5 was not functional in this assay. None of the antibodies altered the measured IL-2 production by
10 control 3A9 T cells or 3A9 T cells transfected with mouse LAG-3 protein, demonstrating the specificity of the stimulatory effect.

Example 6: Tumor Growth Inhibition by Anti-LAG-3 mAb, Alone or in Combination

To test the ability of anti-LAG-3 antibody, alone or in combination with another
15 immunostimulatory antibody, to inhibit the growth of tumor cells *in vivo*, two different syngeneic mouse tumor graft models were used. The first model used murine Sa1N fibrosarcoma cells. The second model used the murine MC38 colon cancer cell line.

In a first experiment, mice (A/J strain) were each implanted with 2 x 10⁶ Sa1N fibrosarcoma cells on day 0 and the tumor cells were allowed to grow for seven days.
20 On day 7, day 10 and day 12 post-implantation, the mice were treated with 10 mg/kg of either an anti-LAG-3 mAb alone (the rat anti-mouse LAG-3 mAb C9B7W; eBioscience, Cat. No. 14-2231), an anti-PD-L1 antibody alone (an anti-mouse PD-L1 mAb 14D8), the anti-LAG-3 and anti-PD-L1 antibodies in combination, or an IgG1 isotype control antibody. The 14D8 mAb is a rat anti-mouse PD-L1 antibody that has been chimerized
25 to contain the mouse IgG1 and mouse kappa constant regions.

Tumor volumes in the mice were measured for over 50 days post-implantation and mean and median tumor volumes were determined. Mean tumor growth inhibition was calculated (based on treatment with the isotype control IgG1 antibody being 0% inhibition). The results for day 24 post-implantation are summarized below in Table 9:

5 Table 9: Mean Tumor Growth Inhibition in Sa1N Tumor Model

<u>Day</u>	<u>IgG1</u>	<u>LAG-3</u>	<u>PD-L1</u>	<u>Combo</u>
24	-	68	74.9	95.8

Thus, anti-LAG3 antibody alone, or anti-PD-L1 antibody treatment alone, resulted in tumor growth inhibition, while the combination of both antibodies led to even greater tumor growth inhibition. With respect to the treatment groups, by the end of the
10 experiment the results were that 4 of 10 mice treated with anti-LAG3 alone became tumor free, whereas only 1 of 10 mice treated with the control IgG1 antibody became tumor free. Similarly, 4 of 11 mice treated with anti-PD-L1 alone were rendered tumor free. Treatment of mice with the combination of anti-LAG3 and anti-PD-L1 resulted in 9 of 10 mice becoming tumor free; the remaining mouse not tumor free had an indolent
15 tumor that remained small throughout the study.

Two additional studies used mice implanted with cells of the murine MC38 colon cancer cell line. In the first experiment, C57Bl/6 mice were each implanted with 2 x 10⁶ MC38 cells on day 0, and were treated on day 7, day 10 and day 12 post-implantation with 200 µg/dose of anti-LAG-3 alone (C9B7W mAb), anti-PD-1 alone
20 (the 4H2 mAb) or anti-LAG-3 and anti-PD-1 in combination. An IgG1 isotype matched antibody, at 400 µg/dose, was used as a control. The 4H2 mAb is a rat anti-mouse PD-1 antibody that has been chimerized to contain the mouse IgG1 and mouse kappa constant regions.

Mean tumor volume, median tumor volume and % survival was determined at 80
25 days post-implantation. The results showed that LAG-3 monotherapy in this tumor model (MC38) showed little or no activity in inhibiting tumor growth and none of the treated mice survived the duration of the experiment. In contrast, anti-PD-1 monotherapy showed significant activity, with 4 of 10 mice tumor free at the end of the experiment. Moreover, similar to the results with the Sa1N model, the combination
30 therapy of anti-LAG-3 plus anti-PD-1 was more effective than either treatment alone, with 7 of 8 mice being tumor free at the end of the experiment.

In a second experiment with the MC38 model, C57Bl/6 mice were each implanted with 2×10^6 MC38 cells on day 0, and were treated on day 5, day 8 and day 11 post-implantation with 200 $\mu\text{g}/\text{dose}$ of test antibody and/or 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ control IgG antibody, as follows: (i) an anti-IgG1 control antibody; (ii) an anti-LAG-3 mAb (C9B7W mAb) together with the control IgG1; (iii) an anti-PD-1 antibody (4H2) together with the control IgG1; (iv) an anti-CTLA-4 antibody (the 9D9 mouse anti-mouse CTLA-4 mAb) together with the control IgG1; (v) the anti-LAG-3 mAb together with the anti-PD-1 mAb; or (vi) the anti-LAG-3 mAb together with the anti-CTLA-4 mAb. The 9D9 mAb is a mouse anti-mouse CTLA-4 antibody that was raised in a mouse in which the endogenous mouse CTLA-4 had been knocked out.

Mean tumor volume, median tumor volume and % survival was determined for over 100 days post-implantation. The results were similar to the first experiment in that LAG-3 monotherapy showed little or no activity in inhibiting MC38 tumor growth and none of the treated mice survived the duration of the experiment. CTLA-4 monotherapy also showed little or no activity in inhibiting MC38 tumor growth and none of the treated mice survived the duration of the experiment. In contrast, anti-PD-1 monotherapy again showed significant activity, with 4 of 10 mice tumor free at the end of the experiment. Moreover, again combination therapy was more effective than monotherapy. For mice treated with the combination of anti-LAG-3 and anti-CTLA-4, 3 of 10 mice were tumor free at the end of the experiment and for the mice treated with the combination of anti-LAG-3 and anti-PD-1, 8 of 10 mice were tumor free at the end of the experiment.

Thus, the above-described *in vivo* tumor graft studies demonstrated that, for at least certain tumor models, anti-LAG antibody treatment alone resulted in significant inhibition of tumor growth *in vivo*. Furthermore, for multiple tumor models, the combination therapy of anti-LAG-3 antibody together with either anti-PD-1 antibody, anti-PD-L1 antibody or anti-CTLA-4 antibody resulted in even greater anti-tumor activity than monotherapy alone.

Example 7: Promotion of Autoimmunity in NOD Mice by Inhibition by Anti-LAG-3 mAb

To test the ability of anti-LAG-3 antibody to stimulate an immune response, as indicated by the development of autoimmunity, the NOD mouse model of diabetes was utilized. NOD mice are known to be prone to developing autoimmune diabetes.

Progression of diabetes can be followed in female NOD mice by measuring serum glucose. Thus, the effect of anti-LAG-3 treatment, alone or in combination with either immunostimulatory antibodies, on the development of diabetes in female NOD mice was examined.

5 Female NOD mice were treated on day 0, day 2 and day 5 with 250 µg/dose of either: (i) an IgG1 isotype control antibody; (ii) anti-LAG-3 mAb alone (C9B7W mAb); (iii) anti-PD-1 mAb alone (4H2 mAb); (iv) anti-CTLA-4 mAb alone (9D9 mAb); (v) anti-LAG-3 mAb together with anti-PD-1 mAb; or (vi) anti-LAG-3 mAb together with anti-CTLA-4. The results demonstrated with anti-LAG-3 treatment alone or anti-PD-1
10 treatment alone (but not anti-CTLA-4 treatment alone) increased the number of mice converting to the diabetic phenotype. Moreover, the combination treatment of anti-LAG-3 plus anti-PD-1, or anti-LAG-3 plus anti-CTLA-4, was even more effective in converting mice to the diabetic phenotype.

 Thus, these results demonstrate that blockade of LAG-3 interaction with its
15 receptor interfered with a negative immunoregulatory signal that allowed for greater immunological activity in the NOD mice, and this greater immunological activity in the LAG-3 treated mice could be enhanced by combination treatment with either anti-PD-1 or anti-CTLA-4 antibody.

Example 8: Immunohistochemistry Using Anti-LAG-3 mAbs

20 In this experiment, fluorescently-labeled anti-LAG-3 human antibodies were used in immunohistochemistry experiments. The following FITC-labeled, human anti-LAG-3 antibodies were used: 25F7-FITC (F:P = 2.9; IgG1 version); 25F7-G4-FITC (F:P = 2.7; IgG4 version); 8B7-FITC (F:P = 2.6) and 26H10-FITC (F:P = 3.4). A panel of lymphoid tissues, specifically tonsil (two samples), spleen (two samples) and thymus
25 (two samples), was examined, along with pituitary tissue (four samples). LAG-3 transfected CHO cells also were used as a control. Acetone-fixed cryostat sections were used. The sections were stained with FITC-labeled anti-LAG-3 antibody (0.2-5 µg/ml), followed by staining with a rabbit anti-FITC antibody as a bridge antibody and then visualization using the rabbit EnVision™+ System Kit (Dako USA, Carpinteria, CA).
30 The results are summarized below in Table 10.

Table 10: Immunohistochemistry using Anti-LAG-3 mAbs

<u>Tissue</u>	<u>25F7-FITC</u>	<u>25F7-G4-FITC</u>	<u>8B7-FITC</u>	<u>26H10-FITC</u>
CHO/LAG-3 Cells	+ (strong)	+ (strong)	+ (strong)	+ (strong)
Tonsil (n=2)	+ (strong; rare in scattered LC, 2/2)	+ (strong; rare in scattered LC, 2/2)	+ (strong; rare in scattered LC, 2/2)	+ (strong; rare in scattered LC, 2/2)
Spleen (n=2)	+ (very weak, mainly in red pulp, 2/2)	+ (very weak, mainly in red pulp, 2/2)	+ (weak, mainly in red pulp, 2/2)	+ (very weak, mainly in red pulp, 2/2)
Thymus (n=2)	+ (strong; very rare in scattered LC, 1/2)	+ (strong; very rare in scattered LC, 1/2)	+ (strong; very rare in scattered LC, 1/2)	+ (strong; very rare in scattered LC, 1/2)
Pituitary (n=4)	+ (strong; occasional in adeno-hypophysis, 3/4)	+ (strong; occasional in adeno-hypophysis, 3/4)	-	+ (strong; occasional in adeno-hypophysis, 3/4; weak moderate, rare, 1/4)

LC = lymphocyte; + = positive staining; - = negative staining

As expected, LAG-3 expression was detected in the panel of lymphoid tissue.

- 5
- 10
- Additionally, two of the three anti-LAG-3 antibodies examined, 25F7 (IgG1 and IgG4 versions) and 26H10, exhibited retention in pituitary tissue, whereas one antibody examined, 8B7, did not show this retention in the pituitary tissue. Thus, the immunohistochemistry experiment identified two subsets of anti-LAG-3 antibodies, wherein one subset is retained in pituitary tissue and the other subset is not retained in pituitary tissue.

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>SEQUENCE</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>SEQUENCE</u>
1	V _H CDR1 a.a. 25F7	49	V _H n.t. 25F7
2	V _H CDR1 a.a. 26H10	50	V _H n.t. 26H10
3	V _H CDR1 a.a. 25E3	51	V _H n.t. 25E3
4	V _H CDR1 a.a. 8B7	52	V _H n.t. 8B7
5	V _H CDR1 a.a. 11F2	53	V _H n.t. 11F2
6	V _H CDR1 a.a. 17E5	54	V _H n.t. 17E5
7	V _H CDR2 a.a. 25F7	55	V _K n.t. 25F7
8	V _H CDR2 a.a. 26H10	56	V _K n.t. 26H10
9	V _H CDR2 a.a. 25E3	57	V _K n.t. 25E3
10	V _H CDR2 a.a. 8B7	58	V _K n.t. 8B7
11	V _H CDR2 a.a. 11F2	59	V _K n.t. 11F2
12	V _H CDR2 a.a. 17E5	60	V _K n.t. 17E5
13	V _H CDR3 a.a. 25F7	61	V _H 4-34 germline a.a.
14	V _H CDR3 a.a. 26H10	62	V _H JH5b germline a.a.
15	PVGVV	63	V _k L6 germline a.a.
16	V _H CDR3 a.a. 8B7	64	V _k JK2 germline a.a.
17	V _H CDR3 a.a. 11F2	65	V _H 3-33 germline a.a.
18	V _H CDR3 a.a. 17E5	66	V _H JH6b germline a.a.
		67	V _k A 27 germline a.a.
19	V _K CDR1 a.a. 25F7	68	V _k JK3 germline a.a.
20	V _K CDR1 a.a. 26H10	69	V _H 3-20 germline a.a.
21	V _K CDR1 a.a. 25E3		
22	V _K CDR1 a.a. 8B7	70	V _H JH4b germline a.a.
23	V _K CDR1 a.a. 11F2	71	V _k L-18 germline a.a.
24	V _K CDR1 a.a. 17E5	72	V _k JK4 germline a.a.
		73	V _H 1-24 germline a.a.
25	V _K CDR2 a.a. 25F7	74	V _k JK1 germline a.a.
26	V _K CDR2 a.a. 26H10	75	V _k JK5 germline a.a.
27	V _K CDR2 a.a. 25E3		
28	V _K CDR2 a.a. 8B7	76	PGHPLAPG
29	V _K CDR2 a.a. 11F2	77	HPAAPSSW
30	V _K CDR2 a.a. 17E5	78	PAAPSSWG

		79	GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSW GPRPRRY
31	V _K CDR3 a.a. 25F7	80	GPPAAAPGHPLA
32	V _K CDR3 a.a. 26H10	81	PAAAPGHPLAPG
33	V _K CDR3 a.a. 25E3	82	AAPGHPLAPGPH
34	V _K CDR3 a.a. 8B7	83	PGHPLAPGHPA
35	V _K CDR3 a.a. 11F2	84	HPLAPGHPAAP
36	V _K CDR3 a.a. 17E5	85	LAPGHPAAPSS
		86	PGHPAAPSSWG
37	V _H a.a. 25F7	87	PHPAAPSSWGPR
38	V _H a.a. 26H10	88	PAAPSSWGPRPR
39	V _H a.a. 25E3	89	APSSWGPRPRRY
40	V _H a.a. 8B7	90	GPPAPAPGHPPAPGHRPAA PYSWGPRPRRY
41	V _H a.a. 11F2		
42	V _H a.a. 17E5	91	atgtgggaggctcagttcctg
		92	gtcagagctgctccggctc
43	V _K a.a. 25F7	93	Rhesus LAG-3 clone pa23-5 a.a.
44	V _K a.a. 26H10	94	Rhesus LAG-3 a.a. (XM_001108923)
45	V _K a.a. 25E3		
46	V _K a.a. 8B7		
47	V _K a.a. 11F2		
48	V _K a.a. 17E5		

What is claimed:

1. An isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human LAG-3 and exhibits at least one of the following properties:
 - (a) binds monkey LAG-3;
 - (b) does not bind mouse LAG-3;
 - (c) inhibits binding of LAG-3 to major histocompatibility (MHC) class II molecules; and
 - (d) stimulates an immune response.
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody exhibits at least two of properties (a), (b), (c) and (d).
3. The antibody of claim 1, wherein the antibody exhibits at least three of properties (a), (b), (c) and (d).
4. The antibody of claim 1, wherein the antibody exhibits all four properties (a), (b), (c) and (d).
5. The antibody of claim 1, wherein the antibody stimulates interleukin-2 (IL-2) production in an antigen-specific T cell response.
6. The antibody of claim 1, wherein the antibody stimulates an anti-tumor immune response.
7. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds an epitope of human LAG-3 comprising the amino acid sequence PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76).
8. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds an epitope of human LAG-3 comprising the amino acid sequence HPAPPSSW (SEQ ID NO: 77) or PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78).

9. The antibody of claim 1, wherein said antibody binds to human LAG-3 with a K_D of 1×10^{-7} M or less.

10. The antibody of claim 1, wherein said antibody binds to human LAG-3 with a K_D of 1×10^{-8} M or less.

11. The antibody of claim 1, wherein said antibody stains pituitary tissue by immunohistochemistry.

12. The antibody of claim 1, wherein said antibody does not stain pituitary tissue by immunohistochemistry.

13. An isolated human monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, wherein the antibody cross-competes for binding to human LAG-3 with a reference antibody, wherein the reference antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43;

(b) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44;

(c) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46;

(d) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45;

(e) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47; or

(f) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

14. The antibody of claim 13, wherein the reference antibody comprises:
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37
and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43.

15. The antibody of claim 13, wherein the reference antibody comprises:
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38
and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44.

16. The antibody of claim 13, wherein the reference antibody comprises:
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40
and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46.

17. The antibody of claim 13, wherein the reference antibody comprises:
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39
and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45.

18. The antibody of claim 13, wherein the reference antibody comprises:
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41
and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47.

19. The antibody of claim 13, wherein the reference antibody comprises:
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42
and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

20. An isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-20 gene, a human V_H 4-34 gene, a human V_H 3-33 gene or a V_H 1-24 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

21. An isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L18 gene, a human V_K L6 gene or a human V_K A27 gene, wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

22. An isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising:

(a) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-34 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene;

(b) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-33 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K A27 gene;

(c) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-20 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L18 gene;

(d) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 1-24 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene; or

(e) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-33 gene and a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene;

wherein the antibody specifically binds human LAG-3.

23. The antibody of claim 1, which comprises:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 1;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 7;

- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 13;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 19;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 25; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 31.

24. The antibody of claim 1, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 2;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 8;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 14;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 20;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 26; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 32.

25. The antibody of claim 1, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 4;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 10;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 16;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 22;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 28; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 34.

26. The antibody of claim 1, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 3;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 9;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising GGY;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 21;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 27; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 33.

27. The antibody of claim 1, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 5;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 11;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 17;

- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 29; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 35.

28. The antibody of claim 1, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 6;
- (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 12;
- (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 18;
- (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 24;
- (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 30; and
- (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 36.

29. An isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising:

- (a) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-42; and
 - (b) a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 43-48;
- wherein the antibody specifically binds a human LAG-3 protein.

30. The antibody of claim 29, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37; and
- (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 43.

31. The antibody of claim 29, which comprises:

- (a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38; and
- (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44.

32. The antibody of claim 29, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46.

33. The antibody of claim 29, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45.

34. The antibody of claim 29, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 47.

35. The antibody of claim 29, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 42; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 48.

36. A composition comprising the antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 1, and a pharmaceutically acceptable carrier.

37. An immunoconjugate comprising the antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 1, linked to a therapeutic agent.

38. A composition comprising the immunoconjugate of claim 37 and a pharmaceutically acceptable carrier.

39. The immunoconjugate of claim 37, wherein the therapeutic agent is a cytotoxin.
40. A composition comprising the immunoconjugate of claim 39 and a pharmaceutically acceptable carrier.
41. The immunoconjugate of claim 37, wherein the therapeutic agent is a radioactive isotope.
42. A composition comprising the immunoconjugate of claim 41 and a pharmaceutically acceptable carrier.
43. An isolated nucleic acid molecule encoding the antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 1.
44. An expression vector comprising the nucleic acid molecule of claim 43.
45. A host cell comprising the expression vector of claim 44.
46. A method for preparing an anti-LAG-3 antibody which comprises expressing the antibody in the host cell of claim 45 and isolating the antibody from the host cell.
47. A method of stimulating an antigen-specific T cell response comprising contacting said T cell with the antibody of claim 1 such that an antigen-specific T cell response is stimulated.
48. The method of claim 47, wherein interleukin-2 production by the antigen-specific T cell is stimulated.
49. A method of stimulating an immune response in a subject comprising administering the antibody of claim 1 to the subject such that an immune response in the subject is stimulated.

50. The method of claim 49, wherein the subject is a tumor-bearing subject and an immune response against the tumor is stimulated.

51. The method of claim 49, wherein the subject is a virus-bearing subject and an immune response against the virus is stimulated.

52. A method for inhibiting growth of tumor cells in a subject comprising administering to the subject the antibody of claim 1 such that growth of the tumor is inhibited in the subject.

53. A method for treating viral infection in a subject comprising administering to the subject the antibody of claim 1 such that the viral infection is treated in the subject.

54. A method of stimulating an immune response in a subject comprising administering to the subject an anti-LAG-3 antibody and at least one additional immunostimulatory antibody such that an immune response in the subject is stimulated.

55. The method of claim 54, wherein the at least one additional immunostimulatory antibody is an anti-PD-1 antibody.

56. The method of claim 54, wherein the at least one additional immunostimulatory antibody is an anti-PD-L1 antibody.

57. The method of claim 54, wherein the at least one additional immunostimulatory antibody is an anti-CTLA-4 antibody.

58. The method of claim 54, wherein the anti-LAG-3 antibody is a human antibody.

59. The method of claim 54, wherein the anti-LAG-3 antibody is a chimeric or humanized antibody.

60. The method of claim 54, wherein the at least one additional immunostimulatory antibody is a human antibody.

61. The method of claim 54, wherein the at least one additional immunostimulatory antibody is a chimeric or humanized antibody.

62. A method for preparing an anti-LAG-3 antibody comprising:

(a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-6, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7-12, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13-14, GGY and 16-18; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-24, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25-30, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 31-36;

(b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and

(c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

Anti-LAG3 25F7 VH

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGURE 1A

Anti-LAG3 25F7 VK

V segment: L6
J segment: JK2

```

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

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

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

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

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

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

FIGURE 1B

Anti-LAG3 26H10 VH

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURE 2A

Anti- LAG3 26H10 VK

V segment: A27
J segment: JK3

```

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

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

                                CDR2
      ~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S
S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC
   AGC

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

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

      CDR3
      ~~~~~
      Q   Y   G   S   S   P   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D   I
K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC
   AAA
```

FIGURE 2B

Anti-LAG3 25E3 VH

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

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

CDR 1

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

CDR 2

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

CDR 2

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

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

CDR 3

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

T V S S
325 ACC GTC TCC TCA

FIGURE 3A

Anti-LAG3 25E3 VK

V segment: L18
J segment: JK2

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

CDR 1

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

CDR 2

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

CDR 2

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

CDR

3

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

CDR 3

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

FIGURE 3B

Anti-LAG3 8B7 VH

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

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

CDR1

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

CDR2

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

CDR2

G N T N C N P S L K S R V T I S G
D
163 GGA AAC ACC AAC TGC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GGA
GAT
T S K K Q F A L K L N S V T A A D
T
217 ACG TCC AAG AAA CAG TTC GCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC
ACG

CDR3

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

CDR3

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

FIGURE 4A

Anti-LAG3 8B7 VK

V segment: L6
J segment: JK4

```

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

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

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

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

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

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

FIGURE 4B

Anti- LAG3 11F2 VH

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

G T H D Q V Q L V Q S G A E V K K P
1 ACC CAC GAC CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT
GGG

CDR 1

~~~~~  
A S V K V S C K V S G Y T L T E V  
S  
55 GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA GTA  
TCC

CDR 1  
2

CDR

~~~~~  
~~~~~  
M H W V R Q A P G K G L E W M G G  
F  
109 ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGT  
TTT

CDR 2

~~~~~  
D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V
T
163 GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC
ACC

M T E D T S T D T A Y M E L S S L
R
217 ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG
AGA

CDR 3

~~~~~  
S E D T A V Y Y C A T A F V V V V  
A  
271 TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA ACA GCC TTT GTA GTG GTG GTA  
GCT

CDR 3

~~~~~  
A S D Y W G Q G T L V T V S S
325 GCT TCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURE 5A

Anti-LAG3 11F2 VK

V segment: L6
J segment: JK1

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

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

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

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

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

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

FIGURE 5B

Anti-LAG3 17E5 VH

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGURE 6A

Anti-LAG3 17E5 VK

V segment: L6
J segment: JK5

```

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

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

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

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

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

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

FIGURE 6B

Anti-LAG3 25F7 VH

CDR1
4-34 germline Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A
V Y G G S F S G Y Y W S W
25F7 VH - - - - -
- - - - - D - - - N -

CDR2
4-34 germline I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y
N P S L K S R V T I S V D
25F7 VH - - - - - N - N - - S
- - - - - L - L -

CDR3
4-34 germline T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C
A R
JH5b germline
N W F D
25F7 VH - - - - - R - - - - -
- F G Y S D Y E Y - - - -

JH5b germline P W G Q G T L V T V S S
25F7 VH - - - - - (JH5b)

FIGURE 7

Anti-LAG3 25F7 VK

CDR1

L6 germline

R A S Q S V S S

25F7 VK

- - - - - I - -

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C

- - - - -

CDR2

L6 germline

A T G I P A R F

25F7 VK

- - - - -

Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R

- - - - -

CDR3

L6 germline

Y Y C Q Q R S N

25F7 VK

- - - - -

S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V

- - - - -

L6 germline

JK2 germline

25F7 VK

W P

T F G Q G T K L E I K

- - L - - - - N - - - -

(JK2)

FIGURE 8

Anti-LAG3 26H10 VH

CDR1
3-33 germline Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C
A A S G F T F S S Y G M H W
26H10 VH - - - - -
- - - - -

CDR2
3-33 germline V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K
Y Y A D S V K G R F T I S R
26H10 VH - - - - -
- - - - -

CDR3
3-33 germline D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y
Y C A R
JH6b germline
Y G
26H10 VH - - - - -
- - - - E W A V A S W D - -

JH6b germline M D V W G Q G T T V T V S S
26H10 VH - - - - -

FIGURE 9

Anti-LAG3 26H10 VK

CDR1
A27 germline E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S
C R A S Q S V S S S Y L A W
26H10 VK - - - - -
- - - - -

CDR2
A27 germline Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G
I P D R F S G S G S G T D F
26H10 VK - - - - -
- - - - -

CDR3
A27 germline T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S
S P
JK3 germline
F T F G P G T K V D I K
26H10 VK - - - - -
- - - - -

FIGURE 10

Anti-LAG3 25E3 VH

CDR1
3-20 germline E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A
S G F T F D D Y G M S W
25E3 VH - - - - -
- - - - -

CDR2
3-20 germline V R Q A P G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y
A D S V K G R F T I S R
25E3 VH - - - - - Y -
- - - - - G

CDR 3
3-20 germline D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y H C
A R
JH4b germline
Y W G Q G T L V
25E3 VH - - - - - Y -
T T G G - - - - -

JH4b germline T V S S
25E3 VH - - - - (JH4B)

FIGURE 11

Anti-LAG3 25E3 VK

CDR 1

L18 germline

25E3 VK1

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
A S Q G I S S
- - - - - R -

CDR 1

CDR2

L18 germline

25E3 VK1

A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E
S G V P S R F
- - - - -

CDR3

L18 germline

25E3 VK1

S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y
Y C Q Q F N S
- - - - -

CDR 3

L18 germline

JK2 germline

Y P
Y T F G Q G T K L E I K (JK2)

FIGURE 12

Anti-LAG3 8B7 VH

CDR1
4-34 germline Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C
A V Y G G S F S G Y Y W S W
8B7 VH - - - - -
- - - - -

CDR2
4-34 germline I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N
Y N P S L K S R V T I S V D
8B7 VH - - - - - R - N - -
C - - - - - G -

CDR3
4-34 germline T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y
C A R G
JH5b germline
D
8B7 VH - - - K - - A - - - N - - - - -
- - - - - E -

JH5b germline P W G Q G T L V T V S S
8B7 VH S - - P - - - - -

FIGURE 13

Anti-LAG3 8B7 VK

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

FIGURE 14

Anti-LAG3 11F2 VH

CDR1
1-24 germline (T H A)Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
K V S C K V S G Y T L T E L S M H W
11F2.6 VH - - D - - - - - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - - - - - V - - - -

CDR2
1-24 germline V R Q A P G K G L E W M G G F D P E D G E
T I Y A Q K F Q G R V T M T E
11F2.6 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - - - - - -

CDR3
1-24 germline D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V
Y Y C A T
JH4b germline
D
11F2.6 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - -
- - - - - A F V V V V A A S -

JH4b germline Y W G Q G T L V T V S S
11F2.6 VH - - - - - - - - - - - - - (JH4b)

Please note: THA is from the predicted leader sequence of VH 1-24

FIGURE 15

Anti-LAG3 11F2 VK

CDR1

L6 germline

L S C R A S Q S V S S

11F2.6 VK

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T

CDR2

L6 germline

S N R A T G I P A R F

11F2.6 VK

Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A

CDR3

L6 germline

F A V Y Y C Q Q R S N

11F2.6 VK

S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D

L6 germline

JK1 germline

11F2.6 VK

W P
W T F G Q G T K V E I K
-(JK1)

FIGURE 16

Anti-LAG3 17E5 VH

CDR1

3-33 germline Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S

C A A S G F T F S S Y G M H W

17E5 VH - - H - - - - - - - - - - - - - - - -

- - - - -

CDR2

3-33 germline V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N

K Y Y A D S V K G R F T I S R

17E5 VH - - - - - - - - - - - - - - - -

- - - - -

CDR3

3-33 germline D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V

Y Y C A R

2-2 germline

C S S T S C Y

17E5 VH - - - - - - - - - - - - - - - -

- - - - - D P H - - - - N - -

2-2 germline T

JH4b germline F D Y W G Q G T L V T V S S

17E5 VH L - - - - - - - - - - - - - - - -

FIGURE 17

Anti-LAG3 17E5 VK

| | |
|-------------------|---|
| <u>CDR1</u> | |
| L6 germline | E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S |
| C R A S Q S V S S | |
| 17E5 VK | - - - - - |
| - - - - - | |
| <u>CDR2</u> | |
| L6 germline | Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N |
| R A T G I P A R F | |
| 17E5 VK | - - - - - |
| - - - - - | |
| <u>CDR3</u> | |
| L6 germline | S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A |
| V Y Y C Q Q R S N | |
| 17E5 VK | - - - - - |
| - - - - - | |
| L6 germline | W P |
| JK5 germline | I T F G Q G T R L E I K |
| 17E5 VK | - - - - - |

FIGURE 18

1

50

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (1)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAEQEGAPAQLPCSPTIPL

cDNA Clone pa23-5 (1)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAEQEGAPAQLPCSPTIPL

51

100

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (51)

QDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT

cDNA Clone pa23-5 (51)

QDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT

extra loop peptide

101

150

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (101)

VLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT

cDNA Clone pa23-5 (101)

VLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT

151

200

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (151)

VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASV

cDNA Clone pa23-5 (151)

VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASV

201

250

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (201)

HWFRSRGQGRVPVQGSPHHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFN

cDNA Clone pa23-5 (201)

HWFRSRGQGRVPVQGSPHHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFN

251

300

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (251)

VSIMYNLTVLGLPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAP

cDNA Clone pa23-5 (251)

VSIMYNLTVLGLPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAP

301

350

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (301)

PGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGQQLNATVTLAI

cDNA Clone pa23-5 (301)

PGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGQQLNATVTLAI

351

400

Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (351)

ITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA

cDNA Clone pa23-5 (351)

ITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA

401

FIGURE 19

450
Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (401)
QEAQLLSQPWQCQLHQGETLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL
cDNA Clone pa23-5 (401)
QEAQLLSQPWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL
451

500
Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (451)
PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE
cDNA Clone pa23-5 (451)
PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE
Transmembrane Domain
501

534
Rhesus LAG-3 (XM_001108923) (501)
ELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL-
cDNA Clone pa23-5 (501)
ELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL-

FIGURE 19 Cont.

ANTICUERPOS HUMANOS QUE SE UNEN AL GEN 3 DE ACTIVACION
LINFOCITARIA (LAG-3) Y LOS USOS DE ESTOS

Antecedentes de la invención

5 El gen 3 de activación linfocitaria o LAG-3 (también conocido como CD223), es un miembro de la familia supergénica de las inmunoglobulinas y está estructural y genéticamente relacionado con CD4. El LAG-3 no se expresa en linfocitos de la sangre periférica en reposo, pero se expresa en linfocitos
10 T y en linfocitos citolíticos espontáneos. La LAG-3 es una proteína de membrana codificada por un gen localizado en la parte distal del brazo corto del cromosoma 12, cerca del gen CD4, lo que sugiere que el gen LAG-3 puede haber evolucionado mediante duplicación genética (Triebel et al. (1990) *J. Exp.*
15 *Med.* 171:1393-1405).

Al igual que el CD4, se ha demostrado que la LAG-3 interacciona con moléculas del MHC de clase II pero, a diferencia del CD4, la LAG-3 no interacciona con la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (Baixeras et
20 al. (1992) *J. Exp. Med.* 176:327-337). Los estudios con una proteína de fusión LAG-3 inmunoglobulínica (sLAG-3Ig) demostraron una unión directa y específica de la LAG-3 al MHC de clase II sobre la superficie celular (Huard et al. (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:1180-1186).

25 En los estudios *in vitro* de las respuestas de

linfocitos T específicas para un antígeno, la adición de anticuerpos anti-LAG-3 produjo un aumento en la proliferación de linfocitos T, una mayor expresión de antígenos de activación, tales como CD25, y mayores concentraciones de citocinas, tales como interferón gamma e interleucina 4, lo que respalda la teoría de que la interacción entre LAG-/MHC de clase II desempeña una función en la estimulación reductora dependiente del antígeno de linfocitos T CD4⁺ (Huard et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:3216-3221). Se ha demostrado que la región intracitoplásmica de la LAG-3 interacciona con una proteína llamada LAP, que se cree es una molécula de transducción de señales involucrada en la reducción de la vía de activación de CD3/TCR (Iouzalén et al. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:2885-2891). Además, se ha detectado que los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ reguladores (T_{reg}) expresan la LAG-3 al activarse y los anticuerpos contra la LAG-3 inhiben la supresión por parte de los linfocitos T_{reg} tanto en *in vitro* como en *in vivo*, lo cual sugiere que la LAG-3 contribuye a la actividad supresora de los linfocitos T_{reg} (Huang, C. et al. (2004) *Immunity* 21:503-513). Es más, se ha detectado que la LAG-3 regula de forma negativa la homeostasis de linfocitos T por parte de los linfocitos T reguladores tanto en mecanismos dependientes como independientes del linfocito T (Workman, C.J. and Vignali, D.A. (2005) *J. Immunol.* 174:688-695).

En ciertas circunstancias, se ha detectado que la

LAG-3 también posee efectos inmunoestimuladores. Por ejemplo, las células tumorales transfectadas con LAG-3 trasplantadas en ratones singénicos mostraron una reducción acusada del crecimiento o regresión total en comparación con células tumorales que no habían sido transfectadas, lo que sugiere que la expresión de la LAG-3 en las células tumorales estimuló una respuesta antitumoral mediante la estimulación de las células presentadoras de antígenos a través de moléculas del MHC de clase II (Prigent et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:3867-3876). Además, se ha detectado que la proteína de fusión LAG-3 Ig soluble estimula tanto respuestas inmunitarias humorales como celulares cuando se administran a ratones junto con un antígeno, lo que indica que la LAG-3 Ig soluble puede desempeñar las funciones de un adyuvante de una vacuna (El Mir and Triebel (2000) *J. Immunol.* 164:5583-5589). Además, se ha detectado que la LAG-3 Ig soluble humana amplifica la generación *in vitro* de inmunidad específica para un tumor de tipo I (Casati et al. (2006) *Cancer Res.* 66:4450-4460). La actividad funcional de la LAG-3 se examina con más detalle en Triebel (2003) *Trends Immunol.* 24:619-622. En vista de lo anterior, agentes adicionales para modular la actividad de la LAG-3 resultan interesantes.

Breve descripción de la invención

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales

humanos, que se unen específicamente a la LAG-3 y que presentan propiedades funcionales deseables. Estas propiedades incluyen una gran afinidad de unión a la LAG-3 humana, unión a la LAG-3 humana y de mono (p. ej., LAG-3 de mono Cynomolgus y/o Rhesus) pero no a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y/o la capacidad de estimular respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para detectar la proteína LAG-3 o para estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno, como por ejemplo, en un sujeto que padece un tumor o un sujeto portador de un virus.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de éste, donde el anticuerpo se une a la LAG-3 humana y presenta al menos una de las siguientes propiedades:

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

Preferentemente, el anticuerpo presenta al menos dos de las propiedades (a), (b), (c) y (d). Más preferentemente, el anticuerpo presenta al menos tres de las propiedades (a),

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

En una modalidad preferida, el anticuerpo estimula una respuesta de linfocitos T específica para un antígeno, tal como la producción de interleucina 2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específica de un antígeno. En otras modalidades, el anticuerpo estimula una respuesta inmune tal como una respuesta antitumoral (p. ej., inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de injerto tumoral *in vivo*) o una respuesta autoinmunitaria (p. ej., estimula el desarrollo de la diabetes en ratones NOD). En otra modalidad preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76). En otra modalidad preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos HPAPPSSW (SEQ ID NO: 77) o PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). En otras modalidades, el anticuerpo se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menor, se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la LAG-3 humana con una K_D of 5×10^{-9} M o menor, o se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-9} M o menor. En una modalidad, el anticuerpo tiñe tejido pituitario por inmunohistoquímica, mientras que en otra modalidad, el anticuerpo no tiñe tejido pituitario por inmunohistoquímica.

En otro aspecto, esta invención se refiere a un

anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo presenta competencia cruzada por la unión a la LAG-3 humana con un anticuerpo de referencia, donde el anticuerpo de referencia comprende:

5 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

10 (b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

15 (c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

20 (d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

 (e) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; o

25 (f) una región variable de la cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En una modalidad preferida, el anticuerpo de
5 referencia comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43. En otra modalidad preferida, el anticuerpo de referencia comprende una región
10 variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En otra modalidad preferida, el anticuerpo de referencia comprende una región variable de la cadena pesada
15 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45. En otra modalidad preferida, el anticuerpo de referencia comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de
20 aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. En otra modalidad preferida, el anticuerpo de referencia comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y
25 una región variable de la cadena ligera que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47. En otra modalidad preferida, el anticuerpo de referencia comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una región variable de la
5 cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la
10 cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano, un gen V_H 4-34 humano, un gen V_H 3-33 humano o un gen V_H 1-24 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de unión a
15 antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano, un gen V_K L6 humano o un gen V_K A27 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En una modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo
20 monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 4-34 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de
25 un gen V_K L6 humano;

(b) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-33 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K A27 humano;

5 (c) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano;

10 (d) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-24 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano; o

(e) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-33 humano y una región
15 variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano;

donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

En otro aspecto, la invención se refiere a un
20 anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno de este, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 37-42;

25 (b) una región variable de la cadena ligera que

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 43-48;

donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

5 Una combinación preferida comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43.

10 Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

15 Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

20 Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

25 Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

5 Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

10 Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. En una modalidad preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG4. En otra modalidad preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG4 que posee una mutación de serina
15 a prolina en la región constante de la región bisagra de la cadena pesada (en una posición que se corresponde con la posición 241 conforme a lo que se describe en Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108), de forma que se reduce o suprime la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las
20 cadenas pesadas. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos de cadena sencilla.

Esta divulgación también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o
25 una porción de unión a antígeno de este, enlazado a un agente

terapéutico, p. ej., una citotoxina o un isótopo radioactivo. Esta divulgación también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de la invención enlazado a un segundo grupo funcional
5 con una especificidad de unión distinta al anticuerpo o porción de unión a antígeno de este.

Se proporcionan también composiciones que comprenden un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, o un inmunoconjugado o una molécula biespecífica de la invención y
10 un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También quedan contempladas en esta divulgación las moléculas de ácido nucleico que codifiquen los anticuerpos, o las porciones de unión a antígeno de estos, de la invención, así como también los vectores de expresión que comprenden
15 tales ácidos nucleicos y las células huésped que comprenden tales vectores de expresión. También se proporcionan los métodos de preparación de anticuerpos anti-LAG-3 que utilizan las células huésped que comprenden tales vectores de expresión y que pueden incluir los pasos de (i) expresión del anticuerpo
20 en la célula huésped y (ii) aislamiento del anticuerpo de la célula huésped.

En otro aspecto, la invención se refiere a los métodos de estimulación de respuestas inmunitarias utilizando los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención. Por ejemplo, en
25 una modalidad, la invención proporciona un método de

estimulación de una respuesta de un linfocito T específica para un antígeno que comprende poner el linfocito T en contacto con un anticuerpo de la invención de forma que se estimule una respuesta del linfocito T específica para el antígeno. En una modalidad preferida, se estimula la producción de interleucina 2 por parte del linfocito T específico para el antígeno. En otra modalidad, la invención proporciona un método de estimulación de una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para un antígeno) en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo de la invención al sujeto de forma que se estimule una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para el antígeno) en el sujeto. En una modalidad preferida, el sujeto es un sujeto que padece un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. En otra modalidad preferida, el sujeto es un sujeto portador de un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de forma que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. En otro aspecto más, la invención proporciona un método para tratar una infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de forma que se trate la infección vírica en el sujeto.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional, tal como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4, de forma que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo para inhibir el crecimiento tumoral o estimular una respuesta antivírica. En una modalidad, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-1. En otra modalidad, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-L1. En otra modalidad más, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-CTLA-4. En una modalidad, el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo de la divulgación. Como alternativa, el anticuerpo anti-LAG-3 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado. En otra modalidad, el anticuerpo inmunoestimulador adicional (p. ej., el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o el anticuerpo anti-CTLA-4) es un anticuerpo humano. Como alternativa, el anticuerpo inmunoestimulador adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-LAG-3. El método comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de

la región variable de la cadena pesada que comprende una
secuencia CDR1 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID
NOS: 1-6, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo conformado
por SEQ ID NOS: 7-12 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del
5 grupo conformado por SEQ ID NOS: 13-14, GGY y 16-18; y/o (ii)
una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena
ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo
conformado por SEQ ID NOS: 19-24, una secuencia CDR2
seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOS: 25-30 y/o
10 una secuencia CDR3 seleccionada del grupo conformado por SEQ
ID NOS: 31-36;

(b) alterar al menos un residuo aminoacídico de la
secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena
pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de
15 la cadena ligera para crear al menos una secuencia de
anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada
como una proteína.

Otras peculiaridades y ventajas de la presente
20 divulgación serán evidentes a partir de la siguiente
descripción detallada y de los ejemplos, los cuales no deben
ser considerados como limitantes. El contenido de todas las
referencias, entradas en Genbank, patentes y solicitudes de
patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud se
25 incorporan expresamente a la presente por referencia.

Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

25 La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de

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

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

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

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

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

25 La Figura 12 muestra la alineación de la secuencia

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

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

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

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

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

25 La Figura 17 muestra la alineación de la secuencia

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

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

10 La Figura 19 muestra la alineación de la secuencia proteica codificada por el clon pa23-5 de ADNc de la LAG-3 de mono (SEQ ID NO: 93) con la secuencia de la proteína LAG-3 de mono rhesus depositada en Genbank (SEQ ID NO: 94) (N.º de acceso en Genbank XM_001108923). La región peptídica del bucle
15 extra y el dominio transmembrana están subrayados. El aminoácido diferente entre las dos secuencias (posición de aminoácido 419) está resaltado en negrita.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos
20 monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a la LAG-3 humana y que presentan propiedades funcionales deseables. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención se derivan de secuencias de la línea germinal de cadena pesada y ligera particulares y/o
25 comprenden características estructurales particulares, tales

como regiones CDR que comprenden secuencias particulares de aminoácidos. Esta divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos de fabricación de tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden
5 tales anticuerpos, y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Esta divulgación también se refiere a los métodos de utilización de los anticuerpos, tales como para detectar una proteína LAG-3, así como también a los métodos de
10 utilización de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para estimular respuestas inmunes, solos o combinados con otros anticuerpos inmunoestimuladores. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona métodos de utilización de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para, por ejemplo,
15 inhibir el crecimiento tumoral o tratar una infección vírica.

Para que la presente divulgación pueda comprenderse más fácilmente, se definen, en primer lugar, ciertos términos. Se presentan otras definiciones adicionales en la descripción detallada.

20 El término "LAG-3" se refiere al gen 3 de activación linfocitaria. El término "LAG-3" incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para una proteína LAG-3 humana pueden, en ciertos casos, presentar reactividad cruzada con una proteína LAG-3 de
25 una especie no humana. En otras modalidades, los anticuerpos

específicos para una proteína LAG-3 humana pueden ser completamente específicos para la proteína LAG-3 humana y puede que no presenten reactividad cruzada con otras especies u otros tipos de reactividad cruzada, o puede que presenten reactividad cruzada con la LAG-3 de otras especies determinadas pero no de todas las demás especies (p. ej., que presente reactividad cruzada con la LAG-3 de mono pero no con la LAG-3 de ratón). El término "LAG-3 humana" se refiere a la secuencia de la LAG-3 humana, tal como la secuencia de aminoácidos completa de la LAG-3 humana con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. El término "LAG-3 de ratón" se refiere a la secuencia de la LAG-3 de ratón, tal como la secuencia de aminoácidos completa de la LAG-3 de ratón con N.º de acceso en Genbank NP_032505. La LAG-3 se conoce también en la materia como, por ejemplo, CD223. La secuencia de la LAG-3 humana puede diferenciarse de la LAG-3 humana con N.º de acceso en Genbank NP_002277 al poseer, p. ej., mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y la LAG-3 posee sustancialmente la misma función biológica que la LAG-3 humana con N.º de acceso en Genbank NP_002277. Por ejemplo, una función biológica de la LAG-3 humana es poseer un epítipo en el dominio extracelular de la LAG-3 que se une específicamente a un anticuerpo de la presente divulgación, o una función biológica de la LAG-3 humana es la unión a moléculas del MHC de clase II.

Se pretende que el término "LAG-3 de mono" englobe las proteínas LAG-3 expresadas por monos del nuevo mundo y del viejo mundo, incluidas, pero sin limitarse a, LAG-3 de monos cynomolgus y LAG-3 de monos rhesus. Una secuencia de aminoácidos representativa para la LAG-3 de mono es la secuencia de aminoácidos de la LAG-3 de mono rhesus que se muestra en la Figura 19 y la SEQ ID NO: 85, la cual está también depositada con el N.º de acceso en Genbank XM_001108923. Otra secuencia de aminoácidos representativa para la LAG-3 de mono es la secuencia alternativa del clon pa23-5 de mono rhesus que se muestra en la Figura 19 y la SEQ ID NO: 84, aislada como se describe en el Ejemplo 3A, subsección 3. Esta secuencia alternativa de rhesus presenta un único aminoácido diferente en la posición 419 en comparación con la secuencia depositada en Genbank.

Una secuencia particular de la LAG-3 humana será, generalmente, al menos un 90% idéntica en la secuencia de aminoácidos de la LAG-3 humana con el N.º de acceso en Genbank NP_002277 y contiene residuos aminoacídicos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana por comparación con secuencias de aminoácidos de la LAG-3 de otras especies (p. ej., Murinos). En ciertos casos, una LAG-3 humana puede ser al menos un 95%, o incluso al menos un 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en la secuencia de aminoácidos de la LAG-3 con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. En ciertas modalidades, una

secuencia de la LAG-3 humana no puede presentar más de 10 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de la LAG-3 con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. En ciertas modalidades, la LAG-3 humana no puede presentar más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de la LAG-3 con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. El porcentaje de identidad se puede determinar como se describe en la presente.

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células mencionadas anteriormente o el hígado (incluidos anticuerpos, citocinas y el complemento) que produce un daño selectivo a, destrucción de o eliminación de patógenos invasores del cuerpo humano, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos normales humanos.

Una "respuesta de linfocito T específica para un antígeno" se refiere a las respuestas por parte de un linfocito T que se deben a la estimulación del linfocito T con el antígeno para el cual el linfocito T es específico. Los ejemplos no limitantes de respuestas de linfocitos T debidas a la estimulación específica de antígenos incluyen la proliferación y la producción de citocinas (p. ej., la

producción de IL-2).

Tal como se hace referencia en la presente al término "anticuerpo", este incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de
5 unión a antígeno") o cadenas simples de estos. Los anticuerpos completos son glucoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviado en la
10 presente como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviado en la presente como V_L) y una región constante de
15 la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio: C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementaridad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas,
20 llamadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestos del amino terminal al carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que
25 interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los

anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, incluidos varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

- 5 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en la presente, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (p. ej., una proteína LAG-3). Se
- 10 ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento
- 15 monovalente constituido por los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab' , que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY
- 20 (Paul ed., 3.^a edición, 1993); (iv) un fragmento Fd constituido por los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv constituido por los dominios V_L y V_H de una única rama de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que está constituido por un dominio V_H ; (vii)
- 25 una región determinante de la complementariedad (CDR)

aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la
cadena pesada que contiene un dominio variable simple y dos
dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del
fragmento Fv, V_L y V_H, estén codificados por genes separados,
5 estos se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante
un conector sintético que les permite convertirlos en una
cadena proteica simple en la cual las regiones V_L y V_H se
parean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv
(scFv); véase, p. ej., Bird et al.. (1988) *Science* 242:423-
10 426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
85:5879-5883). Se pretende también que tales anticuerpos de
cadena simple queden englobados dentro del término "porción de
unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de
anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales con
15 los que estarán familiarizados los expertos en la materia y
los fragmentos se someten a estudios de utilidad del mismo
modo que ocurre con los anticuerpos intactos.

Se pretende que un "anticuerpo aislado", como se
utiliza en la presente, haga referencia a un anticuerpo que
20 está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tengan
especificidades antigénicas diferentes (p. ej., un anticuerpo
aislado que se une específicamente a una proteína LAG-3 está
sustancialmente exento de anticuerpos que se unen
específicamente a antígenos distintos de las proteínas LAG-3).
25 Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína

LAG-3 humana puede, sin embargo, presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las proteínas LAG-3 de otras especies. Es más, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos
5 químicos.

El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza en la presente se refiere a un preparado de moléculas de anticuerpo de composición molecular simple. Una composición de anticuerpos
10 monoclonales exhibe una única especificidad y afinidad de unión a un epítipo particular.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluya anticuerpos que poseen regiones variables en las cuales tanto las regiones de
15 entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención
20 pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o dirigida *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano",
25 como se utiliza en la presente, incluya anticuerpos en los

cuales se han insertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" hace
5 referencia a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones de entramado como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos son
10 producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, p. ej., un ratón transgénico, que posee un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanos fusionados a una célula inmortalizada.

15 La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o
20 transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de estos (descrito con mayor detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de
25 una genoteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos

y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que impliquen el corte y empalme de las secuencias génicas humanas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes poseen regiones variables en las cuales las regiones de entramado y las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas modalidades los anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o mutagénesis somática *in vivo* si se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humana) y así las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son las secuencias que, aunque se deriven de las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana y se relacionen con estas, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

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

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan de forma intercambiable en la presente con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" hace referencia a cualquier forma modificada del anticuerpo humano,

p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humanizado" haga referencia a anticuerpos en los cuales se han injertado
5 secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región de entramado en las secuencias del entramado humano.

Se pretende que la expresión "anticuerpo quimérico"
10 haga referencia a anticuerpos en los cuales las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la
15 región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Se pretende que un anticuerpo que "se une específicamente a la LAG-3 humana", como se utiliza en la presente, haga referencia a un anticuerpo que se une a la proteína LAG-3 humana (y posiblemente a una proteína LAG-3 de
20 una o más especies no humanas) pero no se une sustancialmente a proteínas que no sean LAG-3. Preferentemente, el anticuerpo se une a la proteína LAG-3 humana con "alta afinidad", es decir, con una K_D de 1×10^{-7} M o menor, más preferentemente de 5×10^{-8} M o menor, más preferentemente de 3×10^{-8} M o menor,
25 más preferentemente de 1×10^{-8} M o menor, más preferentemente

de 5×10^{-9} M o menor o incluso más preferentemente de 1×10^{-9} M o menor.

La expresión "no se une sustancialmente" a una proteína o células, como se utiliza en la presente, significa
5 que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o células, es decir, se une a la proteína o células con una K_D de 1×10^{-6} M o mayor, más preferentemente de 1×10^{-5} M o mayor, más preferentemente de 1×10^{-4} M o mayor, más preferentemente de 1×10^{-3} M o mayor, aún más preferentemente
10 de 1×10^{-2} M o mayor.

Se pretende que el término " K_{asoc} " o " K_a ", como se utiliza en la presente, haga referencia a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que se pretende que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se
15 utiliza en la presente, haga referencia a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se pretende que el término " K_D ", como se utiliza en la presente, haga referencia a la constante de disociación, que se obtiene de la proporción de K_d respecto a K_a (es decir,
20 K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos pueden ser determinados usando los métodos debidamente establecidos en el arte. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizando la resonancia de plasmones superficiales,
25 preferentemente usando un sistema biosensor tal como un

sistema Biacore®.

El término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que posee una K_D de 1×10^{-7} M o menor, más preferentemente de 5×10^{-8} M o menor, incluso más
5 preferentemente de 1×10^{-8} M o menor, incluso más preferentemente de 5×10^{-9} M o menor e incluso más preferentemente de 1×10^{-9} M o menor para un antígeno de interés. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, la unión de
10 "alta afinidad" para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menor, más preferentemente de 10^{-7} M o menor, incluso más preferentemente de 10^{-8} M o menor.

El término "sujeto" incluye cualquier animal humano
15 o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, gallinas, anfibios y reptiles, aunque se prefieren los mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros,
20 gatos, vacas y caballos.

En las siguientes subsecciones se describen varios aspectos de la invención con más detalle.

Anticuerpos anti-LAG-3 que poseen propiedades funcionales particulares

25 Los anticuerpos de la invención se caracterizan por

características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a la LAG-3 humana y se pueden unir a la LAG-3 de otras especies determinadas, p. ej., LAG-3 de mono (p. ej.,
5 mono cynomolgus, mono rhesus), pero no se unen sustancialmente a la LAG-3 de otras especies determinadas, p. ej., LAG-3 de ratón. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humana con alta afinidad.

La capacidad del anticuerpo de estimular una
10 respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de linfocito T específica para un antígeno, puede venir indicada por, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo de estimular la producción de interleucina 2 (IL-2) en una respuesta de linfocito T específica para un antígeno. En ciertas
15 modalidades, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humana pero no presenta una capacidad para estimular una respuesta de linfocito T específica para un antígeno. En otras modalidades, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humana pero no presenta una capacidad para estimular una
20 respuesta de linfocito T específica para un antígeno. Otros medios mediante los cuales se puede evaluar la capacidad del anticuerpo de estimular una respuesta inmunitaria incluyen la capacidad del anticuerpo de inhibir el crecimiento tumoral, tal como en un modelo de injerto tumoral *in vivo* (véase, p.
25 ej., el Ejemplo 6) o la capacidad del anticuerpo de estimular

una respuesta autoinmunitaria, tal como la capacidad de inducir el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria en un modelo autoinmunitario, tal como la capacidad de inducir el desarrollo de la diabetes en el modelo de ratones NOD (véase, 5 p. ej., el Ejemplo 7).

La unión de un anticuerpo de la invención a la LAG-3 se puede evaluar utilizando una o más de las técnicas debidamente establecidas en la materia. Por ejemplo, en una modalidad preferida, un anticuerpo se puede estudiar mediante 10 un ensayo de citometría de flujo en el que el anticuerpo se hace reaccionar con una línea celular que expresa la LAG-3 humana, tal como las células CHO que han sido transfectadas para expresar la LAG-3 (p. ej., la LAG-3 humana o la LAG-3 de mono (p. ej., mono rhesus o cynomolgus) o la LAG-3 de ratón) 15 en su superficie celular (véase, p. ej., el Ejemplo 3A para más información sobre un ensayo adecuado). Otras células adecuadas para utilizar en los ensayos de citometría de flujo incluyen linfocitos T $CD4^+$ activados estimulados con anti-CD3, que expresan la LAG-3 natural. Además o como alternativa, la 20 unión del anticuerpo, incluida la cinética de la unión (p. ej., el valor de K_D) se puede estudiar en ensayos de unión BIAcore (véase, p. ej., el Ejemplo 3B para más información sobre ensayos adecuados). Otros ensayos de unión adecuados incluyen ensayos ELISA, por ejemplo, utilizando una proteína 25 LAG-3 recombinante (véase, p. ej., el Ejemplo 1 para más

información sobre un ensayo adecuado).

Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 2×10^{-8} M o menor, se
5 une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 4×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 3×10^{-9} M o menor, se
une a una proteína LAG-3 con una K_D de 2×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 1×10^{-9} M o menor, se
10 une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5×10^{-10} M o menor, o se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 1×10^{-10} M o menor.

Normalmente, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 en tejidos linfoides, tales como amígdala, bazo o timo, lo cual se puede detectar por inmunohistoquímica.
15 Además, como se describe con más detalle en el Ejemplo 8, ciertos anticuerpos anti-LAG-3 de la invención tiñen el tejido pituitario (p. ej., se retienen en la pituitaria) según se midió por inmunohistoquímica, mientras que otros anticuerpos anti-LAG-3 de la invención no tiñen el tejido pituitario (p.
20 ej., no se retienen en la pituitaria) según se midió por inmunohistoquímica. Por lo tanto, en una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 humano que tiñe el tejido pituitario por inmunohistoquímica, mientras que en otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-
25 LAG-3 humano que no tiñe el tejido pituitario por

inmunohistoquímica.

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

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

Los anticuerpos preferidos de la invención son los anticuerpos monoclonales humanos 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2
10 y 17E5 aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 37-42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ
15 ID NOs: 43-48, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a la LAG-3 humana, las secuencias V_H y V_L pueden "mezclarse y emparejarse" para crear otras moléculas de unión anti-LAG-3 de la invención. Preferentemente, cuando las cadenas V_H y V_L
20 están mezcladas y emparejadas, una secuencia V_H de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. De modo análogo, preferentemente una secuencia V_L de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar.

25 Por consiguiente, en un aspecto, esta divulgación

proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo
5 conformado por SEQ ID NOs: 37-42; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 43-48;

donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-
10 3 humana.

Las combinaciones de cadena ligera y pesada preferidas incluyen:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una
15 región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una
región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia
20 de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una
región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

25 (d) una región variable de la cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

(e) una región variable de la cadena pesada que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una
región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; o

(f) una región variable de la cadena pesada que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una
10 región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de la cadena ligera de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o
15 17E5, o combinaciones de estas. Las secuencias de aminoácidos
de las CDR1 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se
muestran en SEQ ID NOs: 37-42, respectivamente. Las secuencias
de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7,
11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 43-48, respectivamente.
20 Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 25F7,
26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 13-
14, GGY y 16-18, respectivamente. Las secuencias de
aminoácidos de las CDR1 de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2
y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 19-24, respectivamente. Las
25 secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_K de 25F7, 26H10,

25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 25-30. Las
secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_K de 25F7, 26H10,
25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 31-36,
respectivamente. Las regiones CDR se delinean utilizando el
5 sistema de Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of
Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of
Health and Human Services, N.º de Publicación NIH 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse
a la LAG-3 humana y que la especificidad de unión a antígeno
10 viene proporcionada fundamentalmente por las regiones CDR1,
CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las
secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L pueden "mezclarse y
emparejarse" (es decir, se pueden mezclar y emparejar las CDR
de anticuerpos diferentes, aunque cada anticuerpo debe
15 contener una CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y una CDR1, CDR2 y CDR3
de V_L) para crear otras moléculas de unión anti-LAG-3 de la
invención. La unión a LAG-3 de tales anticuerpos "mezclados y
emparejados" puede estudiarse utilizando los ensayos de unión
descritos anteriormente y en los ejemplos (p. ej., los ELISA y
20 el análisis Biacore®). Preferentemente, cuando se mezclan y
emparejan secuencias CDR de V_H , la secuencia CDR1, CDR2 y/o
CDR3 de una secuencia V_H particular se reemplaza con una o más
secuencias CDR estructuralmente similares. De forma análoga,
cuando las secuencias CDR de V_L se mezclan y emparejan, la
25 secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_L en

particular se reemplaza preferentemente con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. Resultará evidente para un experto en la materia que se pueden crear nuevas secuencias de V_H y V_L sustituyendo una o más secuencias de la
5 región CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares a las de las secuencias CDR divulgadas en la presente para los anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5.

Por consiguiente, en otro aspecto, esta divulgación
10 proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 1-6;

15 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 7-12;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada
20 del grupo conformado por SEQ ID NOs: 13-14, GGY y 16-18;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 19-24;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena
25 ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo conformado por SEQ ID NOs: 25-30; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 31-36;

5 donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1;

10 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 7;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 13;

15 (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 19;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 25; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31.

20 En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2;

25 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 20;

5 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 26; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 32.

10 En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 3;

(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 9;

15 (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende GGY;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 21;

20 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 27; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 33.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

25 (a) una CDR1 de la región variable de la cadena

pesada que comprende SEQ ID NO: 4;

(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena
5 pesada que comprende SEQ ID NO: 16;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 22;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 28; y

10 (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 34.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena
15 pesada que comprende SEQ ID NO: 5;

(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 17;

20 (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 23;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 29; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena
25 ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 6;

5 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 12;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18;

10 (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 24;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 30; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 36.

15 Se sabe con certeza en el arte que el dominio CDR3, independientemente del (de los) dominio(s) CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno cognado, y que previsiblemente se pueden generar múltiples anticuerpos con la misma especificidad de
20 unión basándose en una secuencia CDR3 común. Véanse, por ejemplo, Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994);
25 Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533

(1995); Ditzel et al., *J. Immunol.* 157:739-749 (1996); Berezov et al., *BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi et al., *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995); Bourgeois et al., *J. Virol* 72:807-10 (1998); Levi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993); Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) y Xu and Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). Véase también las Patentes de EE. UU. N.^{os} 6 951 646; 6 914 128; 6 090 382; 6 818 216; 6 156 313; 6 827 925; 5 833 943; 5 762 905 y 5 760 185. Cada una de estas referencias se
10 incorpora a la presente en su totalidad por referencia.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo derivado de un animal humano o no humano, donde el anticuerpo
15 monoclonal es capaz de unirse específicamente a la LAG-3 humana. En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o de rata, donde el
20 anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a la LAG-3. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) retienen las características funcionales
25 de; (c) se unen al mismo epítipo que; y/o (d) tienen una

afinidad de unión similar a la del anticuerpo no humano de partida correspondiente.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o
5 más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, donde el anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a la LAG-3 humana.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona
10 anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a la LAG-3 humana y donde el
15 dominio CDR3 del primer anticuerpo humano sustituye a un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión a la LAG-3 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a la LAG-3 humana. En algunas modalidades, tales anticuerpos
20 de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del primer
25 anticuerpo humano de partida correspondiente.

Anticuerpos que poseen secuencias de la línea germinal particulares

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

Por ejemplo, en una modalidad preferida, esta
10 divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano, un gen V_H 4-34 humano, un gen V_H 3-33 humano o un gen V_H 1-24 humano, donde el anticuerpo se
15 une específicamente a la LAG-3 humana. En otra modalidad preferida, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión de antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano, un gen
20 V_K L6 humano o un gen V_K A27 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otra modalidad preferida más, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena
25 pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano

y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otra modalidad preferida más, esta divulgación proporciona un

5 anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 4-34 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6

10 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otra modalidad preferida más, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se

15 deriva de un gen V_H 3-33 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K A27 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otra modalidad preferida más, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal

20 aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-24 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano, donde el

25 anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otra

modalidad preferida más, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-33 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

Los anticuerpos también pueden poseer una o más de las características funcionales descritas anteriormente en detalle, tales como una alta afinidad de unión a la LAG-3 humana, la unión a la LAG-3 de mono, la carencia de unión a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno.

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

respectivamente, es el anticuerpo 17E5.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia particular de la línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una genoteca de inmunoglobulina humana expresada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal por comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y por selección de la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que es la más similar en secuencia (es decir, el % de identidad máximo) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia particular de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede contener aminoácidos diferentes en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas espontáneas o a la introducción intencional de una mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es

normalmente al menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos aminoacídicos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparan con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (p. ej., las secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95%, o incluso al menos un 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de la línea germinal humana no presentará más de 10 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano no puede presentar más de 5, o incluso más de 4, 3, 2 ó 1, aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

20 Anticuerpos homólogos

En otra modalidad más, un anticuerpo de la invención comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente y donde los anticuerpos retienen las

propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención. Por ejemplo, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la
5 cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

(a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo
10 constituido por SEQ ID NOs: 37-42;

(b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 43-48; y

15 (c) el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

Además o como alternativa, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes características funcionales indicadas anteriormente, tales como una alta afinidad de unión
20 a la LAG-3 humana, la unión a la LAG-3 de mono, la carencia de unión a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno.

25 En varias modalidades, el anticuerpo puede ser, por

ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos V_H y/o V_L pueden ser un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que posee regiones V_H y V_L con una alta homología (es decir, un 80% o mayor) a las regiones V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente se puede obtener por mutagénesis (p. ej., la mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifica SEQ ID NOs: 49-54 ó 55-60, seguida del análisis del anticuerpo alterado codificado para determinar la función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Como se utiliza en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de homología = $\#$ de posiciones idénticas/ $\#$ total de posiciones $\times$ 100), teniendo en cuenta el número de lagunas y la longitud de cada laguna, que precisa(n) ser introducida(s) para la alineación óptima de las dos secuencias. Se puede conseguir comparar las secuencias y determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias

utilizando un algoritmo matemático como el que se describe en los ejemplos no limitantes que aparecen más adelante.

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

Además o como alternativa, las secuencias de proteínas de la presente divulgación pueden utilizarse además como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda de comparación con las bases de datos públicas a fin de, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3,

para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al.,
5 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por defecto de los respectivos programas resultan útiles (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

10 En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde una o más de estas secuencias CDR
15 comprenden secuencias específicas de aminoácidos basadas en los anticuerpos preferidos descritos en la presente (p. ej., 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2, 17E5) o modificaciones conservadoras de estos, y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-LAG-3
20 de la invención. Se sobreentiende en la materia que se pueden realizar ciertas modificaciones conservadoras de las secuencias que no suprimen la unión al antígeno. Véanse, p. ej., Brummell et al. (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov et al. (1997) *J. Biol.*
25 *Chem.* 272:26864-26870; Hall et al. (1992) *J. Immunol.*

149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 y Beers et al. (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43. Por consiguiente, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o
5 una porción de unión al antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde:

10 (a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 13-14, GGY y 16-18, y modificaciones conservadoras de estas;

15 (b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 31-36 y modificaciones conservadoras de éstas; y

20 (c) el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

Además o como alternativa, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes características funcionales descritas anteriormente, tales como una alta afinidad de unión
25 a la LAG-3 humana, la unión a la LAG-3 de mono, la carencia de

unión a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno.

5 En una modalidad preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7-12 y modificaciones conservadoras de éstas; y la secuencia CDR2 de la región
10 variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 25-30 y modificaciones conservadoras de éstas. En otra modalidad preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de la
15 cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1-6 y modificaciones conservadoras de éstas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos
20 seleccionada del grupo conformado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19-24 y modificaciones conservadoras de éstas.

 En varias modalidades, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o
25 anticuerpo quimérico.

Se pretende que el término "modificaciones de secuencia conservadoras", como se utiliza en la presente, haga referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención por medio de técnicas estándares de uso común en la materia, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el residuo aminoacídico se sustituye por un residuo aminoacídico que posee una cadena lateral similar. Se han caracterizado en la materia las familias de los residuos aminoacídicos que poseen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, se puede

reemplazar uno o más residuos aminoacídicos en las regiones CDR de un anticuerpo de la invención por otros residuos aminoacídicos de la misma familia de cadena lateral y se puede realizar un análisis del anticuerpo alterado para determinar la función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) empleando los ensayos funcionales descritos en la presente.

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

10 En otra modalidad, esta divulgación proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo de la LAG-3 que cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 de la invención (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de presentar competición cruzada por la unión a la LAG-3 humana con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). En modalidades preferidas, el anticuerpo de referencia para los estudios de la competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5.

20 Se pueden identificar tales anticuerpos que presentan competición cruzada basándose en su capacidad para competir de forma cruzada con 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y/o 17E5 en los ensayos estándares de unión a la LAG-3. Por ejemplo, se pueden utilizar los ensayos ELISA estándares en los cuales una proteína LAG-3 recombinante humana se

25

inmoviliza en la placa, se marca uno de los anticuerpos con una marca fluorescente y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no marcados de competir por la unión con el anticuerpo marcado. Además o como alternativa, el análisis

5 BIAcore se puede utilizar para determinar la capacidad de los anticuerpos de presentar competición cruzada. La capacidad de un anticuerpo de ensayo de inhibir la unión de, por ejemplo, 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y/o 17E5, a la LAG-3 humana confirma que el anticuerpo de ensayo puede competir con 25F7,

10 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y/o 17E5 por la unión a la LAG-3 humana y, por lo tanto, se une al mismo epítipo en la LAG-3 humana que el 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y/o 17E5. En una modalidad preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en la LAG-3 humana que el 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 ó 17E5 es un

15 anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en los ejemplos.

Como se indica más detalladamente en el Ejemplo 3C, la unión de 25E3, 25F7 y 8B7 a la LAG-3 humana se ha asignado

20 a una región "bucle extra" en el primer dominio extracelular de la LAG-3 humana. La secuencia de la región de bucle extra se expone en SEQ ID NO: 79. Utilizando un experimento de detección de péptidos, la unión del 25E3 a la región de bucle extra se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos:

25 PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), mientras que la unión del 25F7 a la

región de bucle extra se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos: HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77), y la unión del 8B7 a la región de bucle extra se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos: PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). Por consiguiente, en una
5 modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 que se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76). En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 que se une a un epítipo de la LAG-3 humana
10 que comprende la secuencia de aminoácidos HPAPPSSW (SEQ ID NO: 77) o PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78).

Anticuerpos sintetizados por ingeniería genética y modificados

Un anticuerpo de la invención se puede preparar
15 además utilizando un anticuerpo que posee una o más secuencias V_H y/o V_L divulgadas en la presente como material de partida para sintetizar por ingeniería genética un anticuerpo modificado. El anticuerpo modificado puede poseer propiedades del anticuerpo de partida alteradas. Un anticuerpo puede
20 sintetizarse por ingeniería genética modificando uno o más residuos en una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de entramado. Además o como alternativa, un anticuerpo se puede sintetizar por ingeniería genética
25 modificando los residuos en la región o regiones constantes

para, por ejemplo, alterar la función o las funciones efectoras del anticuerpo.

En ciertas modalidades, se pueden utilizar injertos de CDR para sintetizar por ingeniería genética regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interaccionan con los antígenos de interés predominantemente a través de los residuos aminoacídicos que están situados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y de la cadena ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que en las secuencias que no pertenecen a las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos específicos espontáneos construyendo vectores de expresión que incluyan las secuencias CDR del anticuerpo específico espontáneo injertadas en las secuencias de entramado de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, p. ej., Riechmann *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 225 539; 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 y 6 180 370).

Por consiguiente, otra modalidad de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión

a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 1-6, SEQ ID NOs: 7-12 y SEQ ID NOs: 13-14, GGY y 16-18, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 19-24, SEQ ID NOs: 25-30 y SEQ ID NOs: 31-36, respectivamente. Por lo tanto, los anticuerpos que contienen las secuencias CDR de V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5 pueden contener secuencias de entramado diferentes de estos anticuerpos.

Dichas secuencias de entramado pueden ser obtenidas de bases de datos de ADN públicas o de las referencias publicadas que incluyen secuencias del gen del anticuerpo de la línea germinal. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para genes de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera humanas en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible de Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat *et al.* (1991), cited *supra*; Tomlinson *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox *et al.*

(1994) " A Directory of Human Germline V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; el contenido de las cuales se incorpora expresamente a la presente por referencia. A modo de otro ejemplo, las

5 secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de las cadenas ligera y pesada humanas se pueden encontrar en la base de datos del Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal encontradas en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles con los

10 siguientes números de acceso en Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). A modo de otro ejemplo, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal encontradas en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles con los

15 siguientes números de acceso en Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NG_0010109 y NT_024637), 4-34 (NG_0010109 y NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias de proteínas del anticuerpo se

20 comparan con una base de datos de secuencias de proteínas compilada usando uno de los métodos de búsqueda de similitud entre secuencias llamado el Gapped BLAST (Altschul et al. (1997), *supra*), con el que estarán familiarizados los expertos en la materia.

25 Las secuencias de entramado preferidas para utilizar

en los anticuerpos de la invención son aquéllas que son estructuralmente similares a las secuencias de entramado utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, p. ej., similares a las secuencias de entramado V_H 3-20 (SEQ ID NO: 69), V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61), V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65) o V_H 1-24 (SEQ ID NO: 73) y/o las secuencias de entramado V_K L18 (SEQ ID NO: 71), V_K L6 (SEQ ID NO: 63) o V_K A27 (SEQ ID NO: 67) utilizadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K se pueden injertar en las regiones de entramado que poseen la secuencia idéntica a aquella encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal a partir del cual la secuencia de entramado se deriva, o las secuencias CDR se pueden injertar en las regiones de entramado que contienen una o más mutaciones comparadas con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos en las regiones de entramado para mantener o fomentar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 y 6 180 370).

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos aminoacídicos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar de esta forma una o más propiedades de la unión (por ejemplo, la afinidad) al

anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida o mutagénesis
mediada por PCR puede realizarse para introducir la o las
mutaciones, y se puede evaluar el efecto sobre la unión del
anticuerpo u otra propiedad funcional de interés en ensayos *in*
5 *vitro* o *in vivo* como los que se describen en la presente y se
proporcionan en los ejemplos. Se introducen modificaciones
preferiblemente conservadoras (como se indicó anteriormente).
Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o
deleciones de aminoácidos, pero son preferiblemente
10 sustituciones. Es más, normalmente no se alteran más de uno,
dos, tres, cuatro o cinco residuos en una región CDR.

Por consiguiente, en otra modalidad, la presente
divulgación proporciona anticuerpos anti-LAG-3 monoclonales
aislados, o las porciones de unión a antígeno de este, que
15 comprenden una región variable de la cadena pesada que
comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido
por SEQ ID NOs: 1-6 o una secuencia de aminoácidos que tiene
uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o
20 adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 1-6;
(b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de
aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs:
7-12 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres,
cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de
25 aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 7-12; (c) una

región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 13-14, GGY y 16-18, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 13-14, GGY y 16-18;

(d) una región CDR1 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 19-24 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 19-24;

(e) una región CDR2 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 25-30 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 25-30;

(f) una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 31-36 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 31-36.

Los anticuerpos de la invención sintetizados por ingeniería genética incluyen aquellos en los que se han llevado a cabo modificaciones de los residuos de entramado en V_H y/o V_L para, por ejemplo, mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones del entramado se

llevan a cabo para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más residuos de entramado a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo
5 que se ha sometido a mutación somática puede contener residuos de entramado que se diferencian de la secuencia de la línea germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Los residuos se pueden identificar comparando las secuencias de entramado del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las
10 cuales se deriva el anticuerpo.

Por ejemplo, la Tabla A muestra regiones en las que una posición de un aminoácido de la región de entramado (utilizando el sistema de numeración de Kabat) es diferente de la línea germinal y cómo se puede retromutar esta posición a
15 la línea germinal mediante las sustituciones indicadas:

| | | |
|---------------------------------------|---|---------------|
| Tabla A - Ejemplos de retromutaciones | | |
| Región | Posición del aminoácido del entramado (numeración de Kabat) | Retromutación |
| 25E3 V _H | 72 | G72R |
| 25E3 V _H | 95 | Y95H |
| 25E3 V _H | 97 | T97A |
| 25E3 V _H | 98 | T98R |
| 25F7 V _H | 69 | L69I |

| Tabla A cont. - Ejemplos de retromutaciones | | |
|---|---|---------------|
| Región | Posición del aminoácido del entramado (numeración de Kabat) | Retromutación |
| 5 | 25F7 V _H | L71V |
| | 25F7 V _H | R83S |
| | 25F7 V _H | F97R |
| | 8B7 V _H | K76N |
| 10 | 8B7 V _H | A79S |
| | 8B7 V _H | N83S |
| | 8B7 V _H | P112Q |
| | 11F2 V _H | D3A |
| 15 | 17E5 V _H | H3Q |
| | 8B7 V _H | C59Y |
| | 8B7 V _H | C59S |

Otro tipo de modificación del entramado implica mutar uno o más residuos en la región de entramado o incluso en una o más regiones CDR para eliminar los epítomos de los linfocitos T con el fin de reducir de este modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. También se hace referencia a este enfoque como "desinmunización" y se describe más detalladamente en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20030153043.

25 Además o como alternativa a las modificaciones

llevadas a cabo en las regiones CDR o de entramado, los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar por ingeniería genética para que incluyan modificaciones en la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades
5 funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la unión al complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (p. ej., se pueden enlazar una o más partes de grupos químicos al
10 anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar así una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe más detalladamente a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE de Kabat.

15 En una modalidad preferida, el anticuerpo es un anticuerpo isotópico IgG4 que comprende una mutación de Serina a Prolina en la posición correspondiente con la posición 228 (S228P; índice UE) en la región bisagra de la región constante de la cadena pesada. Se ha detectado que esta mutación suprime
20 la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas en la región bisagra (Angal et al. *supra*; la posición 241 se basa en el sistema de numeración de Kabat). Por ejemplo, en varias modalidades, un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención puede comprender una región variable de la cadena
25 pesada de 25F7 (SEQ ID NO: 37) o 26H10 (SEQ ID NO: 38)

enlazada a una región constante de IgG4 humana en la que la Serina en una posición correspondiente con la posición 241 como se describe en Angal *et al.*, *supra*, se ha mutado a Prolina. Por lo tanto, para las regiones variables de la

5 cadena pesada de 25F7 y 26H10 enlazadas a la región constante de IgG4 humana, esta mutación se corresponde con una mutación S228P por el índice UE.

En una modalidad, la región bisagra de CH1 se modifica de manera tal que se altere el número de residuos de

10 cisteína en la región bisagra, p. ej., aumenta o disminuye. Este enfoque se describe además en la Patente de EE. UU. N.º 5 677 425. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar la unión de las cadenas ligeras y pesadas, o para aumentar o disminuir

15 la estabilidad del anticuerpo.

En otra modalidad, se muta la región bisagra Fc de un anticuerpo para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase entre

20 los dominios CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc de forma que el anticuerpo dificulte la unión de la proteína A estafilocócica (SpA) relativa a la unión natural de la SpA con el dominio bisagra Fc. Este enfoque se describe más detalladamente en la Patente de EE. UU. N.º 6 165 745.

25 En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para

aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 6 277 375. Como alternativa, para
5 aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de reciclaje tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 869 046 y 6 121 022.

10 En otras modalidades más, la región de Fc se altera sustituyendo al menos un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico diferente para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoacídicos
15 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un residuo aminoacídico diferente de manera que el anticuerpo posea una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo de partida. El ligando efector cuya afinidad se altera puede ser, por
20 ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este método se describe más detalladamente en las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 624 821 y 5 648 260.

En otro ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoacídicos 329,
25 331 y 322 por un residuo aminoacídico diferente de manera que

el anticuerpo altere la unión a Clq y/o reduzca o suprima la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe más detalladamente en la Patente de EE. UU. N.º 6 194 551.

5 En otro ejemplo, se alteran uno o más residuos aminoacídicos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe además en la Publicación PCT WO 94/29351.

10 En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las
15 siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382,
20 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Este enfoque se describe más detalladamente en la Publicación PCT WO 00/42072. Es más, se han asignado los sitios de unión sobre la IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn, y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase Shields
25 *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostró que

las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoraban la unión a FcγRIII. Además, se demostró que las siguientes mutaciones combinadas mejoraban la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y
5 S298A/E333A/K334A.

En otra modalidad más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede sintetizar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar para, por
10 ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones del carbohidrato se pueden llevar a cabo, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una o más sustituciones de aminoácidos, lo cual
15 produce la eliminación de uno o más sitios de glucosilación en el entramado de la región variable para eliminar de esta forma la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os}. 5 714 350 y 6 350 861.

20 Además o como alternativa, se puede sintetizar un anticuerpo que posee un tipo de glucosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado con cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que posee más estructuras de GlcNac de bisección. Se ha demostrado que tales patrones de
25 glucosilación alterados aumentan la capacidad CCDA de los

anticuerpos. Tales modificaciones del carbohidrato se pueden llevar a cabo por, por ejemplo, expresión del anticuerpo en una célula huésped con el mecanismo de glucosilación alterado. Las células con el mecanismo de glucosilación alterado han sido descritas en la materia y se pueden utilizar como células huésped en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (α -(1,6)-fucosiltransferasa), de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8^{-/-} se crearon mediante la interrupción intencionada del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20040110704 y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). A modo de otro ejemplo, la EP 1 176 195 describe una línea celular con un gen FUT8 interrumpido funcionalmente, que codifica una fucosiltransferasa, de forma que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presenten hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima α -1,6 relacionada con el enlace. La EP 1 176 195 también describe líneas celulares que poseen una actividad enzimática baja para agregar fucosa a la N-acetilglucosamina la cual se une a la región Fc del anticuerpo

o que no posee actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular YB2/0 (ATCC CRL 1662) del mieloma de rata. La Publicación PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para
5 agregar fucosa a los carbohidratos unidos a Asn(297), lo que también produce la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Los anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado también se pueden producir en huevos
10 de gallina, como se describe en la Publicación PCT WO 06/089231. Como alternativa, se pueden producir anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna*. Se divulgan métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal en la
15 Solicitud de Patente de EE. UU. correspondiente de Alston & Bird LLP, N.º de expediente 040989/314911, presentada el 11 de agosto de 2006. La publicación PCT WO 99/54342 describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (p. ej.,
20 $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNac de bisección incrementadas, lo que produce un aumento de la actividad de CCDA de los anticuerpos (véase también
25 Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como

alternativa, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden ser escindidos utilizando una enzima fucosidasa; p. ej., la α -L-fucosidasa para eliminar los residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

5 Otra modificación de los anticuerpos de la presente que está contemplada por esta divulgación es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento de este,
10 normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado aldehídico de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se enlazan al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de
15 acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo hidrosoluble). Se pretende que el término "polietilenglicol", como se utiliza en la presente, englobe cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como
20 mono-(C₁-C₁₀)-alcoxi- o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar proteínas son de uso común en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase,
25 p. ej., EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de esta divulgación se pueden caracterizar por sus diferentes propiedades físicas y sirven para detectar y/o diferenciar sus diferentes clases.

5 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable de la cadena ligera o en la región variable de la cadena pesada. Los sitios de glucosilación pueden producir una mayor inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pK
10 del anticuerpo debido a una unión al antígeno alterada (Marshall et al (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick et al (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol*
15 *Immunol* 37:697-706). Se sabe que la glucosilación tiene lugar en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-LAG-3 que no contenga glucosilación en la región variable. Esto se puede conseguir seleccionando los anticuerpos que no contienen el
20 motivo de glucosilación en la región variable o mutando residuos en la región de glucosilación.

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente divulgación no contienen sitios de isomerismo de asparragina. La desamidación de la asparragina puede tener
25 lugar en las secuencias N-G o D-G y da origen a la creación de

un residuo de ácido isoaspártico que introduce una curvatura en la cadena polipeptídica y disminuye su estabilidad (efecto del ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico (pI) único, que generalmente entrará en el intervalo de pH entre 6 y 9.5. El pI para un anticuerpo IgG1 entra normalmente en el intervalo de pH de 7 y 9.5, y el pI para un anticuerpo IgG4 entra normalmente en el intervalo de pH de 6 y 8. Se sospecha que los anticuerpos con un pI que no pertenece al intervalo normal pueden tener cierto despliegue e inestabilidad en condiciones *in vivo*. Por tanto, es preferible tener un anticuerpo anti-LAG-3 que contenga un valor de pI que entre en el intervalo normal. Esto se puede conseguir seleccionando los anticuerpos con un valor pI en el intervalo normal o mutando residuos superficiales cargados.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, con una temperatura de fusión más elevada indicando una mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Generalmente, es preferible que la T_{M1} (la temperatura inicial de despliegue) sea mayor que 60°C, preferiblemente mayor que 65°C, aún más preferiblemente mayor que 70°C. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando calorimetría diferencial de barrido (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) dicroismo

circular (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una modalidad preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo puede medirse utilizando electroforesis capilar (EC) y MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra modalidad preferida, se seleccionan anticuerpos que presentan efectos de agregación mínimos, lo cual puede conducir a que se desencadene una respuesta inmunitaria no deseada y/o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos con una agregación del 25% o menor son aceptables, preferiblemente del 20% o menor, más preferiblemente del 15% o menor, aún más preferiblemente del 10% o menor y aún más preferiblemente del 5% o menor. La agregación se puede medir mediante varias técnicas, incluyendo columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y dispersión de luz.

Métodos de síntesis de anticuerpos por ingeniería genética

Como se indicó anteriormente, los anticuerpos anti-LAG-3 que poseen secuencias de V_H y V_L divulgadas en la presente se pueden utilizar para crear nuevos anticuerpos anti-LAG-3 modificando las secuencias V_H y/o V_L , o la o las regiones constantes enlazadas a estas. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de

un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, p. ej., 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5, se utilizan para crear anticuerpos estructuralmente relacionados con los anticuerpos anti-LAG-3 que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a la LAG-3 humana. Por ejemplo, se pueden combinar una o más regiones CDR de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5, o mutaciones de estas, recombinantemente con regiones de entramado conocidas y/u otras CDR para crear otros anticuerpos anti-LAG-3 de la invención sintetizados recombinantemente por ingeniería genética, como se indicó anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de síntesis por ingeniería genética es una o más de las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de estas. Para crear el anticuerpo sintetizado por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como proteína) un anticuerpo que posea una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de estas. En vez de esto, se utiliza la información contenida en la o las secuencias como el material de partida para crear una o más secuencias de "segunda generación" derivadas de la o las secuencias originales, y después de esto se prepara la o las secuencias de "segunda generación", y se expresan como una proteína.

Por consiguiente, en otra modalidad, esta divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-LAG-3 que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 1-6, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 7-12 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 13-14, GGY y 16-18; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 19-24, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 25-30 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOs: 31-36;

(b) alterar al menos un residuo aminoacídico de la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Se pueden emplear técnicas de biología molecular estándares para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la o las secuencias de anticuerpo alteradas es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-LAG-3 descritos en la presente, dichas propiedades
5 funcionales incluyen, pero no se limitan a:

- (i) alta afinidad de unión a la LAG-3 humana;
- (ii) unión a la LAG-3 de mono;
- (iii) carencia de unión a la LAG-3 de ratón;
- (iv) una capacidad para inhibir la unión de la LAG-3
10 a las moléculas del MHC de clase II; y/o

(v) una capacidad para estimular una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para un antígeno).

Las propiedades funcionales de los anticuerpos
15 alterados se pueden evaluar utilizando ensayos estándares de uso común en la materia y/o descritos en la presente, tales como aquellos que se exponen en los ejemplos.

En ciertas modalidades de los métodos de síntesis por ingeniería genética de los anticuerpos de la invención,
20 pueden introducirse mutaciones aleatoria o selectivamente a lo largo de la totalidad o en parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-LAG-3, y los anticuerpos anti-LAG-3 modificados resultantes pueden cribarse respecto a su actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se
25 describe en la presente. Existen varios métodos mutacionales

descritos en la materia (véanse, p. ej., las Publicaciones PCT WO 02/092780 y WO 03/074679).

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

5 Otro aspecto de la invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido
10 nucleico está "aislado" o "se presenta sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándares, incluidos el tratamiento SDS/ alcalino, formación de bandas en CsCl, cromatografía de
15 columna, electroforesis en gel de agarosa y otras de uso común en la materia. Véase, Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no
20 secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener empleando técnicas de biología molecular estándares. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo,
25 hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos

portadores de genes de inmunoglobulina humana como se describe a continuación) los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo creado por el hibridoma se pueden obtener por técnicas de amplificación por PCR o clonación de 5 ADNc estándares. Para los anticuerpos obtenidos de una genoteca de genes de inmunoglobulina (p. ej., utilizando técnicas de exposición en fagos), un ácido nucleico que codifica los anticuerpos puede obtenerse de la genoteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidos de la 10 invención son las que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 49-54, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las 15 secuencias V_L de 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5 se muestran en SEQ ID NOs: 55-60, respectivamente.

Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse ulteriormente por técnicas estándar de 20 recombinación de ADN, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de las cadenas de anticuerpos de longitud total, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica 25 otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o

un conector flexible. El término "operativamente unidos", como se utiliza en este contexto, se pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en fase.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud total enlazando operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Se han descrito las secuencias de genes humanos de la región constante de la cadena pesada en la materia (véase, por ejemplo, Kabat *et al.* (1991), *supra*) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener por amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero la más preferible es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar operativamente unido a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

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

de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Se han descrito las secuencias de genes humanos de la región constante de la cadena ligera en la materia (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, *supra*) y los fragmentos de ADN que
5 contienen estas regiones se pueden obtener por medio de amplificación estándar por PCR. En modalidades preferidas, la región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que
10 codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de tal modo que las secuencias V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones V_H y V_L unidas por el
15 conector flexible (véanse, p. ej., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de los anticuerpos monoclonales de la invención

20 Se pueden obtener anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente divulgación utilizando la famosa técnica de hibridación celular somática (hibridoma) de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Otras modalidades para la producción de anticuerpos monoclonales incluyen la transformación
25 oncogénica o vírica de linfocitos B y técnicas de expresión en

fagos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados están debidamente descritos en la materia. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os} 4 816 567; 5 225 539; 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 y 6 180 370, cuyo contenido se incorpora
5 específicamente a la presente en su totalidad por referencia.

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la LAG-3 humana se pueden generar utilizando ratones transgénicos o
10 transcromosómicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en la presente como el ratón HuMAb[®] y el ratón KM[®], respectivamente, y se hace referencia colectivamente a estos
15 en la presente como "ratones portadores de Ig humana".

El ratón HuMAb[®] (Medarex[®] Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de las cadenas pesada (μ y γ) y ligera (κ) humanas no transpuestas, junto con mutaciones direccionadas
20 que desactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (véase, p. ej., Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y como respuesta a la inmunización, los transgenes de las cadenas pesada y ligera humanas introducidos
25 sufren un cambio de clase y una mutación somática para generar

anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg et al. (1994), *supra*; examinado en Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding y Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso del ratón HuMAb[®], y las modificaciones genómicas portadas por los ratones, se describen más detalladamente en Taylor et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, cuyo contenido se incorpora a la presente específicamente en su totalidad por referencia. Véanse además las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 789 650; 5 877 397; 5 661 016; 5 814 318; 5 874 299; 5 770 429; y 5 545 807; las Publicaciones PCT N.^{os} WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 y WO 01/14424, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente por referencia.

En otra modalidad, se pueden generar anticuerpos humanos de la invención utilizando un ratón portador de secuencias de inmunoglobulina humanas en transgenes y

transcromosomas, tal como un ratón portador de un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Se hace referencia a este ratón en la presente como a un "ratón KM[®]" y se describe detalladamente en la 5 Publicación PCT WO 02/43478. También se describe una forma modificada de este ratón, que comprende además un trastorno homocigótico de los genes endógenos del receptor Fc γ RIIB, en la Publicación PCT WO 02/43478 y se hace referencia a este como a un "ratón KM/FCGR2D[®]". Se pueden utilizar también 10 ratones con transgenes de la cadena pesada de HCo7 o HCo12, o de ambos.

Otras modalidades con animales transgénicos incluyen el Xenomouse (Abgenix, Inc., Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 939 598; 6 075 181; 6 114 598; 6 150 584 y 6 162 963). Otras 15 modalidades incluyen "ratones TC" (Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727) y vacas portadoras de transcromosomas de las cadenas pesada y ligera humanos (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894; Publicación PCT WO 02/092812). El contenido de estas patentes 20 y publicaciones se incorpora específicamente a la presente en su totalidad por referencia.

En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se preparan utilizando métodos de expresión en fagos para cribar genotecas de genes de 25 inmunoglobulina humanos. Véanse, p. ej., las Patentes de EE.

UU. N.^{os} 5 223 409; 5 403 484; 5 571 698; 5 427 908; 5 580 717; 5 969 108; 6 172 197; 5 885 793; 6 521 404; 6 544 731; 6 555 313; 6 582 915 y 6 593 081, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente por referencia.

5 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera tal que se puede generar una respuesta del anticuerpo humano tras la inmunización. Véanse, p. ej., las Patentes de
10 EE. UU. N.^{os}. 5 476 996 y 5 698 767, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente por referencia.

En otra modalidad, los anticuerpos anti-LAG-3 humanos se preparan utilizando la exposición en fagos en la que los fagos comprenden ácidos nucleicos que codifican
15 anticuerpos generados en animales transgénicos previamente inmunizados con LAG-3. En una modalidad preferida, el animal transgénico es un ratón HuMab, KM o Kirin. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N.^o 6 794 132, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente por referencia.

20 Inmunización de ratones portadores de Ig humana

En una modalidad de la invención, se inmunizan ratones portadores de Ig humana con un preparado purificado o enriquecido de un antígeno LAG-3, una proteína LAG-3 recombinante o células que expresan una proteína LAG-3.
25 Véanse, p. ej., Lonberg *et al.* (1994), *supra*; Fishwild *et al.*

(1996), *supra*; las Publicaciones PCT WO 98/24884 o WO 01/14424, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente por referencia. En una modalidad preferida, se inmunizan ratones de 6-16 semanas con 5-50 µg de proteína LAG-3. Como alternativa, se utiliza una porción de LAG-3 fusionada a un polipéptido que no sea del tipo LAG-3.

En una modalidad, se inmunizan los ratones transgénicos por vía intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV) con antígeno LAG-3 en el adyuvante completo de Freund, seguido de las subsecuentes inmunizaciones IP o IV con antígeno en el adyuvante incompleto de Freund. En otras modalidades, se utilizan adyuvantes que no sean los de Freund o células completas en ausencia de adyuvante. El plasma puede ser cribado por medio de ELISA y las células de los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-LAG-3 humana se pueden utilizar para las fusiones.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar y fusionar esplenocitos y/o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar según su producción de anticuerpos específicos para el antígeno. La

generación de hibridomas es de uso común en la materia. Véase, p. ej., Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos
5 monoclonales de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden obtenerse también en un transfectoma de células hésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de recombinación de ADN y métodos de transfección de genes como es de uso común en la
10 materia (p. ej., Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). En una modalidad, se inserta ADN que codifica cadenas pesadas y ligeras de longitud parcial o completa obtenido por técnicas estándares de biología molecular en uno o más vectores de expresión de forma que los genes estén operativamente unidos a
15 las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término "operativamente unido" se pretende que signifique que un gen del anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector
20 cumplan con la función deseada de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo.

Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que
25 controlan la transcripción o traducción de los genes de las

5 cadenas de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamíferos incluyen elementos víricos que controlan los niveles de expresión elevados de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (p. ej., el 10 promotor principal tardío de adenovirus (AdMLP) y poliovirus. Como alternativa, se pueden utilizar secuencias reguladoras que no sean víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina. Además, elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el 15 sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano del SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos humanos T tipo 1 (Takebe et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de 20 modo que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada.

Los genes de la cadena ligera del anticuerpo y los genes de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en el mismo o en diferentes vectores de expresión. En modalidades 25 preferidas, las regiones variables se utilizan para crear

genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera del isotipo deseado de forma que el segmento V_H esté operativamente unido al o a los segmentos C_H en el vector y el segmento V_L esté operativamente unido al segmento C_L en el vector. Además o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señalización que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. Los genes de la cadena del anticuerpo se pueden clonar en el vector de forma que el péptido de señalización se una en fase al amino terminal de los genes de la cadena del anticuerpo. El péptido de señalización puede ser un péptido de señalización inmunoglobulínico o un péptido de señalización heterólogo (es decir, un péptido de señalización de una proteína no inmunoglobulínica).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar otras secuencias, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (p. ej, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales el vector ha sido introducido (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os} 4 399 216, 4 634 665 y 5 179 017). Por ejemplo,

el gen marcador seleccionable normalmente confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, o una célula huésped en la cual el vector ha sido introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para utilizar en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexata) y el neo gen (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, se transfecta el o los vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada en una célula huésped por técnicas estándares. Se pretende que las diferentes formas del término "transfección" engloben una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación de calcio-fosfato, transfección de DEAE-dextrano y análogos. Aunque en teoría es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, se prefiere la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente células huésped de mamíferos, porque dichas células eucariotas y, en particular, las células de mamíferos son más propensas a ensamblar y secretar un anticuerpo debidamente plegado e inmunológicamente activo que las células procariotas .

Las células huésped de mamífero preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención

incluyen células ováricas de hámster chino (CHO) (incluidas las células dhfr⁻ CHO, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador de DHFR seleccionable, p. ej., como el que se describe en R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621); células NSO de mieloma; células COS y células SP2. En particular, para utilizar con células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes GS divulgado en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841. Cuando se introducen vectores de expresión que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándares de purificación de proteínas.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Se pueden analizar los anticuerpos de la invención para determinar su unión a la LAG-3 humana, por ejemplo, por ELISA estándar. Las IgG anti-LAG-3 humanas se pueden analizar además para determinar su reactividad con un antígeno LAG-3 por inmunotransferencia de tipo Western. La especificidad de

unión de un anticuerpo de la invención también se puede determinar monitorizando la unión del anticuerpo a las células que expresan una proteína LAG-3, por ejemplo, por citometría de flujo. Estos métodos son de uso común en la materia. Véase, 5 p. ej., Harlow and Lane (1988), citado *supra*.

Inmunosconjugados

Los anticuerpos de esta invención se pueden conyugar con un agente terapéutico para formar un inmunosconjugado tal como un conyugado anticuerpo-fármaco (ADC). Los agentes 10 terapéuticos adecuados incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, ligandos de unión al surco menor de ADN, intercaladores de ADN, entrecruzadores de ADN, inhibidores de la histona deacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteasomas, inhibidores de la topoisomerasa I 15 o II, inhibidores de proteínas de choque térmico, inhibidores de la tirosina cinasa, antibióticos y agentes antimitóticos. En el ADC, el anticuerpo y el agente terapéutico están preferentemente conyugados a través de un conector escindible tal como un conector peptídico, disulfuro o hidrazona. Más 20 preferentemente, el conector es un conector peptídico tal como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO:15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Los ADC se pueden preparar como se describe en las Patentes de EE. UU. N.^{os} 7 087 600; 6 25 989 452 y 7 129 261; las Publicaciones PCT WO 02/096910; WO

07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 y WO 08/103693; las Publicaciones de Patentes de EE. UU. 20060024317; 20060004081 y 20060247295; cuyas divulgaciones se incorporan a la presente por referencia.

5 Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-LAG-3 unido a al menos una molécula funcional diferente, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une al menos a dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. Por lo tanto, como se utiliza en la presente, "molécula biespecífica" incluye moléculas que poseen tres o más especificidades. En una modalidad preferida, la molécula biespecífica comprende una primera especificidad de unión para la LAG-3 y una segunda especificidad de unión para una molécula inductora que recopila células efectoras citotóxicas que pueden matar una célula diana que expresa la LAG-3. Son ejemplos de moléculas inductoras adecuadas CD64, CD89, CD16 y CD3. Véase, p. ej., Kufer et al., *TRENDS in Biotechnology*, 22 (5), 238-244 (2004).

En una modalidad, una molécula biespecífica posee, además de una especificidad de unión para anti-Fc y una especificidad de unión para anti-LAG-3, una tercera especificidad. La tercera especificidad puede ser para un

anti-factor potenciador (EF, por sus siglas en inglés), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína superficial involucrada en la actividad citotóxica y, por lo tanto, aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. Por ejemplo, el anti-factor potenciador puede unirse a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40 ó ICAM-1) u otra célula inmunitaria, lo que da lugar a una mayor respuesta inmunitaria contra la célula diana.

10 Las moléculas biespecíficas pueden presentarse en diferentes formatos y tamaños. En un extremo del espectro de tamaños, una molécula biespecífica retiene el formato tradicional del anticuerpo, a no ser porque en vez de poseer dos ramas de unión de idéntica especificidad, posee dos ramas
15 de unión cada una con una especificidad diferente. En el otro extremo, las moléculas biespecíficas que consisten en dos fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv's) unidos por una cadena peptídica, llamada constructo Bs(scFv)₂. Las moléculas biespecíficas de tamaño intermedio incluyen dos
20 fragmentos F(ab) diferentes unidos por un conector peptidilo. Las moléculas biespecíficas en estos u otros formatos se pueden preparar por ingeniería genética, hibridación somática o métodos químicos. Véase, p. ej., Kufer *et al*, citado *supra*; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998)
25 y van Spriel *et al.*, *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000),

y las referencias citadas en estos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente divulgación formulado junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Puede contener opcionalmente uno o más principios farmacéuticamente activos, tales como otro anticuerpo o un fármaco. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia combinada con, por ejemplo, otro agente inmunoestimulador, un agente anticanceroso, un agente antivírico o una vacuna, de forma que el anticuerpo anti-LAG-3 aumente la respuesta inmunitaria contra la vacuna.

La composición farmacéutica puede comprender múltiples excipientes. Los excipientes que se pueden utilizar incluyen portadores, agentes activos superficiales, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, agentes de suspensión o dispersión, solubilizadores, colorantes, saborizantes, recubrimientos, disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de estos. La selección y el uso de excipientes adecuados se explica en Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia.

Preferiblemente, una composición farmacéutica es

adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., por inyección o infusión). Según la vía de administración, el compuesto activo puede estar recubierto con un material para
5 proteger el compuesto contra la acción de ácidos y de otras condiciones naturales que pueden desactivarlo. La expresión "administración parenteral", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a los diferentes modos de administración aparte de la administración enteral y tópica,
10 normalmente por inyección, e incluye, sin limitar, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular,
15 subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

20 Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal que retiene la actividad biológica del compuesto de partida deseada y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado.
25 Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de

ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos atóxicos, tales como hidróclórico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico y análogos, así como
5 también ácidos orgánicos atóxicos, tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos, y análogos. Las sales de adición de bases incluyen aquellas
10 derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y análogos, así como también de aminas orgánicas atóxicas, tales como N, N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaina y análogas.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. También se pueden formular en forma de una microemulsión, liposoma u otras estructuras ordenadas adecuadas para una alta concentración de fármaco.

20 La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para obtener una forma farmacéutica simple variará dependiendo del sujeto que se está tratando y el modo particular de administración y será generalmente la cantidad de la composición que produzca un
25 efecto terapéutico. Generalmente, de un 100%, esta cantidad

variará de aproximadamente el 0.01% a aproximadamente el 99% de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0.1% a aproximadamente el 70%, más preferentemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% de principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el transcurso de un tiempo determinado o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosis para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. Como se utiliza en la presente, forma farmacéutica unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente.

Para la administración del anticuerpo, la dosis varía desde aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg y más

frecuentemente de 0.01 a 5 mg/kg de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen ejemplar de tratamiento implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez de cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención incluyen 1 mg/kg peso corporal o 3 mg/kg peso corporal mediante administración intravenosa, siendo el anticuerpo administrado mediante uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguidos de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención produce preferentemente una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos exentos de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la incapacidad debidos a la aflicción causada por la

enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos que sufren tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente el crecimiento del tumor al menos aproximadamente en un 20%, más preferentemente al menos 5 aproximadamente en un 40%, aún más preferentemente al menos aproximadamente en un 60% y aún más preferentemente al menos aproximadamente en un 80% con relación a los sujetos sin tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño de un tumor o si no 10 aliviar los síntomas en un sujeto, que suele ser un ser humano o puede ser otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación regulada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro 15 microencapsulados. Se suelen emplear polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como un copolímero de acetato de vinilo y etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery* 20 *Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar mediante dispositivos médicos tales como (1) dispositivos para inyecciones hipodérmicas sin agujas (p. ej., US 5 399 163; 5 383 851; 5 312 335; 5 064 413; 4 941 880; 4 790 824 y 4 596 25

556); (2) bombas para microinfusión (US 4 487 603); (3) dispositivos transdérmicos (US 4 486,194); (4) equipos para infusión (US 4 447 233 y 4 447 224); y (5) dispositivos osmóticos (US 4 439 196 y 4 475 196); cuyas divulgaciones se incorporan a la presente por referencia.

En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para garantizar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención traspasen la barrera hematoencefálica, se pueden formular en forma de liposomas, que pueden comprender además grupos de direccionamiento para potenciar un transporte selectivo a células u órganos específicos. Véase, p. ej., US 4 522 811; 5 374 548; 5 416 016 y 5 399 331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123 y Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos, las composiciones de los anticuerpos y los métodos de la presente invención poseen múltiples usos *in vitro* e *in vivo* relacionados con, por

ejemplo, la detección de la LAG-3 o la potenciación de una respuesta inmunitaria por bloqueo de la LAG-3. En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden administrar 5 estas moléculas a células en cultivos, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, p. ej., *in vivo*, para potenciar la inmunidad en varias situaciones. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto 10 el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de la invención de forma que se modifique la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferiblemente, la respuesta se intensifica, estimula o regula en sentido creciente.

Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos 15 que requieran potenciar una respuesta inmunitaria. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que sufran un trastorno que puede ser tratado mediante el incremento de una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T). En una modalidad 20 particular, los métodos son particularmente adecuados para tratar el cáncer *in vivo*. Para conseguir potenciar la inmunidad específica para un antígeno, se pueden administrar los anticuerpos anti-LAG-3 junto con un antígeno de interés o el antígeno puede que ya esté presente en el sujeto a tratar 25 (p. ej., un sujeto que padece un tumor o portador de un

virus). Cuando los anticuerpos contra la LAG-3 se administran junto con otro agente, se pueden administrar los dos en cualquier orden o simultáneamente.

La invención proporciona además métodos para
5 detectar la presencia del antígeno LAG-3 humano en una muestra o medir la cantidad del antígeno LAG-3 humano, que comprenden poner en contacto la muestra y una muestra de control con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno de este, que se une específicamente a la LAG-3
10 humana, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, o una porción de este, y la LAG-3 humana. Posteriormente se detecta la formación de un complejo. Cuando, al comparar, exista una diferencia en la formación de complejo entre la muestra y la muestra de control
15 esto indica la presencia de antígeno LAG-3 humano en la muestra. Es más, los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención se pueden utilizar para purificar LAG-3 humana mediante purificación según su inmunoadfinidad.

Debido a la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3
20 de la invención de inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del MHC de clase II y estimular respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno, la invención también proporciona métodos de empleo de los anticuerpos de la invención *in vitro* e *in vivo* para estimular, intensificar o aumentar respuestas
25 de linfocitos T específicas para un antígeno. Por ejemplo, la

invención proporciona un método de estimulación de una respuesta de un linfocito T específica para un antígeno que comprende poner el linfocito T en contacto con el anticuerpo de la invención de forma que se estimule una respuesta del
5 linfocito T específica para el antígeno. Cualquier indicador adecuado de una respuesta de linfocito T específica para un antígeno se puede utilizar para medir la respuesta de linfocito T específica del antígeno. Los ejemplos no limitantes de tales indicadores adecuados incluyen una mayor
10 proliferación de linfocitos T en presencia del anticuerpo y/o una mayor producción de citocinas en presencia del anticuerpo. En una modalidad preferida, se estimula la producción de interleucina 2 por parte del linfocito T específico para el antígeno.

15 La invención también proporciona un método de estimulación de una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para un antígeno) en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo de la invención al sujeto de forma que se estimule una respuesta inmunitaria
20 (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para el antígeno) en el sujeto. En una modalidad preferida, el sujeto es un sujeto que padece un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. En otra modalidad preferida, el sujeto es un sujeto portador de un virus y se estimula una
25 respuesta inmunitaria contra el virus.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de forma que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. En otro aspecto más, la invención proporciona un método para tratar una infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de forma que se trate la infección vírica en el sujeto.

Este y otros métodos de la invención se explican con más detalle a continuación.

Cáncer

El bloqueo de la LAG-3 por parte de los anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. En un aspecto, la presente invención hace referencia al tratamiento de un sujeto *in vivo* utilizando un anticuerpo anti-LAG-3 de modo que se inhiba el crecimiento de tumores cancerosos. Puede utilizarse un anticuerpo anti-LAG-3 exclusivamente para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, se puede utilizar un anticuerpo anti-LAG-3 junto con otros agentes inmunogénicos, tratamientos estándares del cáncer u otros anticuerpos, como se describe a continuación.

Por consiguiente, en una modalidad, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto

una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-LAG-3 o una porción de unión a antígeno de este. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-LAG-3 humana descritos en la presente). Además o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-LAG-3 quimérico o humanizado.

Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención incluyen los cánceres típicamente sensibles a inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (p. ej., melanoma maligno metastásico), cáncer renal (p. ej., carcinoma de células claras), cáncer prostático (p. ej., adenocarcinoma prostático refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (p. ej., carcinoma no microcítico de pulmón). Además, la invención incluye cánceres refractarios o recurrentes cuyo crecimiento se puede inhibir utilizando los anticuepos de la invención.

Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos de la invención incluyen cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, carcinoma de las

trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de
cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva,
enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de
esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema
5 endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la
glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal,
sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del
pene, leucemias crónicas o agudas incluidos la leucemia
mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia
10 linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores
sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la
vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis
renal, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), linfoma
primario del SNC, angiogénesis de tumores, tumor del eje
15 raquídeo, glioma del tallo cerebral, adenoma de la hipófisis,
sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células
escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el
medio ambiente incluidos los inducidos por asbesto y
combinaciones de los cánceres. La presente invención también
20 es útil para el tratamiento de cánceres metastásicos,
especialmente de cánceres metastásicos que expresan la PD-L1
(Iwai et al. (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Opcionalmente, los anticuerpos contra la LAG-3 se
pueden combinar con un agente inmunogénico, tal como células
25 cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluidos

- proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidrato), células y células transfectadas con genes codificantes de citocinas inmunoestimulantes (He et al (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitantes de
- 5 vacunas contra tumores que se pueden utilizar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (se explica más detalladamente a continuación).
- 10 En los seres humanos, se ha detectado que algunos tumores son inmunogénicos, como por ejemplo los melanomas. Al aumentar el umbral de activación de linfocitos T mediante el bloqueo de la LAG-3, se pueden activar las respuestas tumorales en el huésped.
- 15 El bloqueo de la LAG-3 es posible que alcance su máxima eficacia cuando se combina con un protocolo de vacunación. Se han desarrollado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S. (2000) *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; véase también Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, cap. 61, págs. 3023-3043 en
- 20 DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of*
- 25

Oncology, quinta edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares alcanzan su máxima efectividad cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un activador potente de la presentación de antígeno para la vacunación contra tumores (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y de los patrones de expresión génica a gran escala en varios tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumores son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que surgió el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Cabe destacar que se puede demostrar que muchos de estos antígenos que son las dianas de linfocitos T específicos para el tumor localizados en el huésped. El bloqueo de la LAG-3 se puede utilizar junto con un conjunto de proteínas y/o péptidos recombinantes expresados en un tumor a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente consideradas como autoantígenos por el sistema inmunitario y son por lo tanto tolerantes a ellas. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la

síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85% de los cánceres humanos y solamente en un número limitado de tejidos somáticos (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Estos tejidos somáticos pueden estar protegidos
5 contra el ataque inmunitario por diversos medios). Los antígenos tumorales también pueden ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de las proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no afines (es decir, bcr-abl en el
10 cromosoma Filadelfia) o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas contra tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la hepatitis (VHB y VHC) y el virus herpético del sarcoma de kaposi (VSHK).
15 Otra forma de antígeno específico de un tumor que se puede utilizar junto con el bloqueo de la LAG-3 es la de las proteínas de choque térmico (PCT) purificadas aisladas del propio tejido del tumor. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y
20 estas PCT son muy eficaces en el suministro a las células presentadoras de antígeno para estimular la inmunidad contra el tumor (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Las células dendríticas (CD) son células
25 presentadoras de antígeno potentes que se pueden utilizar para

cebar respuestas específicas para un antígeno. Las CD se pueden producir *ex vivo* y cargarse con varios antígenos proteínicos y peptídicos así como también extractos de células tumorales (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332).

5 Las CD pueden transducirse por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las CD también se han fusionado directamente a células tumorales a efectos de inmunización (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización con CD se puede

10 combinar eficazmente con el bloqueo de la LAG-3 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de la LAG-3 también se puede combinar con tratamientos contra el cáncer estándares. El bloqueo de la LAG-3 se puede combinar eficazmente con regímenes

15 quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de agente quimioterapéutico administrada (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo anti-LAG-3 combinado con decarbazina para el tratamiento de un melanoma. Otro ejemplo

20 de dicha combinación es un anticuerpo anti-LAG-3 combinado con interleucina 2 (IL-2) para el tratamiento de un melanoma. La base científica racional que respalda el uso combinado del bloqueo de la LAG-3 y quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría

25 de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar como

resultado niveles incrementados de antígeno tumoral en el sistema de presentación del antígeno. Otras terapias combinatorias que pueden dar como resultado sinergia con el bloqueo de la LAG-3 por muerte celular son radiación, cirugía y supresión hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. También se pueden combinar inhibidores de la angiogénesis con el bloqueo de la LAG-3. La inhibición de la angiogénesis produce la muerte de las células tumorales que pueden alimentar el antígeno tumoral en los sistemas de presentación de antígeno del huésped.

Los anticuerpos bloqueantes de la LAG-3 se pueden utilizar también combinados con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor $Fc\alpha$ o $Fc\gamma$ a las células tumorales (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 922 845 y 5 837 243). Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para hacer frente a dos antígenos separados. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biespecíficos anti-receptor Fc/antígeno tumoral (p. ej., Her-2/neu) para dirigir macrófagos a los sitios de un tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas contra tumores. La rama de linfocitos T de estas respuestas podría incrementarse mediante el uso del bloqueo de la LAG-3. Como alternativa, puede suministrarse directamente el antígeno a las CD mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y a

un marcador de la superficie celular específico para células dendríticas.

Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran diversidad de mecanismos. Muchos de
5 estos mecanismos pueden ser contrarrestados mediante la desactivación de las proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras el TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y
10 el ligando Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Pueden utilizarse anticuerpos para cada una de estas entidades combinados con anti-LAG-3 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias a los tumores por parte del huésped.

15 Otros anticuerpos que activan la capacidad de respuesta inmunitaria del huésped se pueden utilizar combinados con anti-LAG-3. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función de las CD y la presentación de antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces
20 de sustituir eficazmente la actividad auxiliar de los linfocitos T (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) y se pueden utilizar junto con anticuerpos de la LAG-3 (Ito et al. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Los anticuerpos activantes de moléculas coestimuladoras de linfocitos T tales
25 como CTLA-4 (p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 5 811 097), OX-40

(Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) también pueden proporcionar niveles incrementados de activación de linfocitos T.

5 El trasplante de médula ósea se está utilizando actualmente para tratar una diversidad de tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad de injerto contra huésped es una consecuencia de este tratamiento, puede obtenerse beneficio terapéutico de las respuestas del injerto
10 contra el tumor. Puede utilizarse el bloqueo de la LAG-3 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos para el tumor injertados en el donante.

Existen también varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión ex vivo
15 de linfocitos T específicos para el antígeno y la transferencia adoptiva de estos linfocitos a los destinatarios para estimular linfocitos T contra el tumor específicos para el antígeno (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Estos métodos pueden utilizarse también para activar las
20 respuestas de linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. La activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-LAG-3 puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

Enfermedades infecciosas

25 Otros métodos de la invención se utilizan para

tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un
5 anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno de este, de forma que se trate la enfermedad infecciosa del sujeto. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-LAG-3 humanos descritos en la presente). Además o como
10 alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

De forma análoga a su aplicación en tumores como se indicó anteriormente, el bloqueo de la LAG-3 mediado por anticuerpos puede utilizarse solo o como adyuvante, combinado
15 con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los cuales puede ser particularmente útil este enfoque terapéutico, incluyen patógenos para los cuales no existe actualmente ninguna vacuna eficaz o patógenos para los cuales
20 las vacunas convencionales no son completamente eficaces. Estos incluyen, pero no se limitan a, VIH, hepatitis (A, B y C), gripe, herpes, giardia, malaria, leishmania, estafilococo aureus y pseudomonas aeruginosa. El bloqueo de la LAG-3 es particularmente útil contra infecciones establecidas por
25 agentes tales como el VIH que presentan antígenos alterados

durante el curso de las infecciones. Estos nuevos epítomos se reconocen como extraños en el momento de la administración de anti-LAG-3 humanos, provocando de este modo una respuesta fuerte de los linfocitos T que no es amortiguada por señales
5 negativas procedentes de la LAG-3.

Algunos ejemplos de virus patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), virus herpéticos (p. ej., VZV, VHS-I, VHA-6, VHS-II y CMV, virus de Epstein-Barr), adenovirus,
10 virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus Cocksackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus de la vacuna, virus VLTH, virus del dengue, papilomavirus, virus del molusco, poliovirus, virus de
15 la rabia, virus de JC y virus arboviral de la encefalitis.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas causantes de infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos y
20 gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y la bacteria de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos causantes de
25 infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen

Candida (*albicans*, *kruzei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.),
Cryptococcus neoformans, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.),
 el género Mucorales (*mucor*, *absidia*, *rizopus*), *Sporothrix*
schenkii, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides*
 5 *brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos causantes de
 infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen
Entamoeba histolytica, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*,
Acanthamoeba sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp.,
 10 *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*,
Trypanosoma brucei, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*,
Toxoplasma gondii, *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos anteriores, el bloqueo de la
 LAG-3 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales
 15 como el tratamiento con citocinas (p. ej., interferones, GM-
 CSF, G-CSF, IL-2) o terapia con anticuerpos biespecíficos, lo
 cual proporciona una mejor presentación de antígenos tumorales
 (véase, p. ej., Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

20 Reacciones autoinmunitarias

Los anticuerpos anti-LAG-3 pueden provocar y
 amplificar respuestas autoinmunitarias. De hecho, la inducción
 de respuestas antitumorales utilizando células tumorales y
 vacunas peptídicas pone de manifiesto que muchas respuestas
 25 antitumorales implican anti-autoreactividades (van Elsas et

al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) *supra*; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Por lo tanto, es posible considerar la
5 utilización del bloqueo de la anti-LAG-3 junto con diversas autoproteínas para elaborar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas autoproteínas para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer da lugar a la acumulación
10 inadecuada del péptido A β en depósitos de amiloide en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide son capaces de eliminar estos depósitos de amiloide (Schenk et al., (1999) *Nature* 400: 173-177).

También se pueden utilizar otras autoproteínas como
15 dianas tales como IgE para el tratamiento de alergias y de asma así como el TNF α para la artritis reumatoide. Por último, se pueden inducir respuestas de anticuerpos a varias hormonas mediante el uso del anticuerpo anti-LAG-3. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes a hormonas reproductoras se pueden
20 utilizar para la anticoncepción. La respuesta de anticuerpos neutralizantes a hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento de tumores particulares también pueden considerarse como posibles dianas de vacunación.

Se pueden utilizar métodos análogos a los descritos
25 anteriormente para el uso del anticuerpo anti-LAG-3 con el fin

de inducir respuestas terapéuticas autoinmunitarias para tratar pacientes que sufran una acumulación inadecuada de otros autoantígenos, tales como depósitos de amiloide, incluidos de A β en la enfermedad de Alzheimer, de citocinas
5 tales como del TNF α , y de IgE.

Vacunas

Se pueden utilizar anticuerpos anti-LAG-3 para estimular respuestas inmunitarias específicas para un antígeno mediante la administración de un anticuerpo anti-LAG-3 junto
10 con un antígeno de interés (p. ej., una vacuna). Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de
15 unión a antígeno de este, de forma que se potencia una respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-LAG-3 humanos descritos en la presente). Además o como alternativa,
20 el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno procedente de un patógeno. Los ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen los indicados en las secciones anteriores,
25 tales como los antígenos tumorales (o vacunas contra tumores)

indicados anteriormente o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

Se conocen perfectamente en la materia las vías adecuadas de administración *in vivo* e *in vitro* de las composiciones de anticuerpo (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención y pueden ser elegidas por un experto en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-LAG-3 humanos de la invención se pueden administrar junto con uno o más agentes terapéuticos diferentes, p. ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o a la vez que el agente o se puede administrar junto con otras terapias de uso habitual, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, tales como doxorubicina

(adriamicina), cisplatino-sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil, dacarbazina y ciclofosfamida-hidroxiurea que, por sí solos, son eficaces solamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por
5 vía intravenosa en una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La administración conjunta de anticuerpos anti-LAG-3 humanos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, de la presente
10 invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que operan mediante diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico sobre las células tumorales humanas. Dicha administración conjunta puede solucionar los problemas ocasionados por el desarrollo de
15 resistencia a los fármacos o por un cambio en la antigenicidad de las células tumorales lo que las harían no reactivas al anticuerpo.

Asimismo, dentro del alcance de la presente invención se encuentran kits que comprenden las composiciones
20 de anticuerpos de la invención (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) y las instrucciones para su empleo. El kit puede contener además como mínimo un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (p. ej.,
25 un anticuerpo humano que posea una actividad complementaria

que se une a un epítopo en el antígeno LAG-3 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso indicado del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado suministrado en o con el kit, o comoquiera que acompañe el kit.

Terapia combinada

En otro aspecto, la invención proporciona métodos de terapia combinada en los que se administra un anticuerpo anti-LAG-3 junto con uno o más anticuerpos adicionales que son eficaces en la estimulación de respuestas inmunitarias para de este modo potenciar, estimular o aumentar las respuestas inmunitarias en un sujeto. Por ejemplo, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y uno o más anticuerpos inmunoestimuladores adicionales, tales como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4, de forma que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o estimular una respuesta antivírica. En una modalidad, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-1. En otra modalidad, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-L1. En otra modalidad más, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-CTLA-

4. En una modalidad, el anticuepro anti-LAG-3 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo de la divulgación. Como alternativa, el anticuerpo anti-LAG-3 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (p. ej., preparado de un mAb anti-LAG-3 de ratón). En otra modalidad, el anticuerpo inmunoestimulador adicional (p. ej., el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA-4) es un anticuerpo humano. Como alternativa, el anticuerpo inmunoestimulador adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (p. ej., preparado a partir de un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA-4).

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer), que comprende administrar un anticuerpo LAG-3 y un anticuerpo CTLA-4 a un sujeto. En modalidades adicionales, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra en una dosis subterapéutica o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-CTLA-4 a un sujeto. En ciertas modalidades, el sujeto es un ser humano. En ciertas

modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 es el anticuerpo monoclonal 10D1 de secuencia humana (descrito en la Publicación PCT WO 01/14424) y el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7, 5 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 ó 17E5 descrito en la presente. Otros anticuerpos anti-CTLA-4 englobados por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los divulgados en: WO 98/42752; WO 00/37504; la Patente de EE. UU. N.º 6 207 156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10 10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Resumen N.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 se une a la CTLA-4 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a la CTLA-4 humana con una K_D de $1 \times 15 10^{-8}$ M o menor, se une a la CTLA-4 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la CTLA-4 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menor.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (p. 20 ej., el cáncer), que comprende administrar un anticuerpo LAG-3 y un anticuerpo PD-1 a un sujeto. En otras modalidades, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-1 se administra en una dosis subterapéutica o se administran ambos en una dosis 25 subterapéutica. En otra modalidad, la presente invención

proporciona un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto. En ciertas modalidades, el sujeto es un ser humano. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 ó 17E5 descrito en la presente. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 de secuencia humana incluyen 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11, que se describen en la Publicación PCT WO 06/121168. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a la PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la PD-1 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menor.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer), que comprende administrar un anticuerpo LAG-3 y un anticuerpo PD-L1 a un sujeto. En otras modalidades, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra en una dosis subterapéutica o se administran ambos en una dosis

subterapéutica. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que

5 comprende administrar un anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-PD-L1 a un sujeto. En ciertas modalidades, el sujeto es un ser humano. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-LAG-3 es

10 un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 ó 17E5 descrito en la presente. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 de secuencia humana incluyen 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, que se describen en la Publicación PCT WO 07/005874. En

15 ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 se une a la PD-L1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a la PD-L1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la PD-L1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la PD-L1 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menor.

20 El bloqueo de la LAG-3 y uno o más antígenos segunda diana tales como CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 por parte de anticuerpos pueden aumentar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. Se incluyen entre los cánceres cuyo crecimiento puede ser inhibido utilizando los anticuerpos de

25 la presente divulgación incluyen cánceres normalmente

sensibles a inmunoterapia. Los ejemplos representativos de cánceres a tratar con la terapia combinada de la presente divulgación incluyen los cánceres específicamente enumerados anteriormente en la explicación de la monoterapia con anticuerpos anti-LAG-3.

En ciertas modalidades, se puede administrar la combinación de anticuerpos terapéuticos indicada en la presente a la vez que una sola composición en un portador farmacéuticamente aceptable, o a la vez que composiciones separadas con cada anticuerpo en un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, la combinación de anticuerpos terapéuticos se puede administrar secuencialmente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, tal como la administración del anticuerpo anti-CTLA-4 en primer lugar y la del anticuerpo anti-LAG-3 en segundo lugar, o la administración del anticuerpo anti-LAG-3 en primer lugar y la del anticuerpo anti-CTLA-4 en segundo lugar. Además o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, tal como la administración del anticuerpo anti-PD-1 en primer lugar y la del anticuerpo anti-LAG-3 en segundo lugar, o la administración del anticuerpo anti-LAG-3 en primer lugar y la del anticuerpo anti-PD-1 en segundo lugar. Además o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-

LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, tal como la administración del anticuerpo anti-PD-L1 en primer lugar y la del anticuerpo anti-LAG-3 en segundo lugar, o la administración del anticuerpo anti-LAG-3 en primer lugar y la
5 del anticuerpo anti-PD-L1 en segundo lugar.

Además, si se administra secuencialmente más de una dosis de terapia combinada, el orden de la administración secuencial puede invertirse o mantenerse en el mismo orden en cada momento de la administración, pueden combinarse
10 administraciones secuenciales con administraciones simultáneas o cualquier combinación de estas. Por ejemplo, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-CTLA-4 en primer
15 lugar y anti-LAG-3 en segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-CTLA-4 en segundo lugar, etc. Además o como alternativa, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser
20 simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-PD-1 en primer lugar y anti-LAG-3 en segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-PD-1 en segundo lugar, etc. Además o como alternativa, la primera administración de una combinación de
25 anticuerpo anti-PD-L1 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser

simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-PD-L1 en primer lugar y anti-LAG-3 en segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-PD-L1 en segundo lugar, etc. Otro regimen
5 de dosificación representativo puede suponer una primera administración que es secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-CTLA-4 (y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) en segundo lugar, y las administraciones posteriores pueden ser simultáneas.

10 Opcionalmente, la combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y uno o más anticuerpos adicionales (p. ej., anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) puede combinarse posteriormente con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluidos proteínas
15 recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidrato), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimuladoras (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitantes de vacunas contra tumores que se pueden utilizar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o
20 tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (se explica más detalladamente a continuación). Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 se puede combinar además con un protocolo de
25 vacunación, tal como cualquiera de los protocolos de

vacunación indicados en detalle anteriormente con respecto a la monoterapia con anticuerpos anti-LAG-3.

Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 también se puede combinar con tratamientos estándares
5 contra el cáncer. Por ejemplo, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, es posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado con la combinación de la presente divulgación
10 (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 combinados a su vez con decarbazina para el tratamiento de un melanoma. Otro ejemplo es una
15 combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 combinados a su vez con interleucina 2 (IL-2) para el tratamiento de un melanoma. La base científica racional que respalda el uso combinado del bloqueo de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 con
20 quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado niveles incrementados de antígeno tumoral en el sistema de presentación del antígeno. Otras terapias combinatorias que
25 pueden dar como resultado sinergia con un bloqueo combinado de

LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 por muerte celular incluyen radiación, cirugía o supresión hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar
5 con un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1. La inhibición de la angiogénesis produce la muerte de las células tumorales, lo cual puede ser una fuente de antígeno tumoral alimentado en los sistemas de presentación de antígeno del huésped.

10 También se puede utilizar una combinación de anticuerpos bloqueantes de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 combinados con anticuerpos biespecíficos que dirigen células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ a las células tumorales (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 922
15 845 y 5 837 243). Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para hacer frente a dos antígenos separados. La rama de linfocitos T de estas respuestas podría incrementarse mediante el uso de un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1.

20 En otro ejemplo, se puede utilizar una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 junto con anticuerpos antineoplásicos, tales como Rituxan[®] (rituximab), Herceptin[®] (trastuzumab), Bexxar[®] (tositumomab), Zevalin[®] (ibritumomab), Campath[®] (alemtuzumab),
25 Lymphocide[®] (epratuzumab), Avastin[®] (bevacizumab), y Tarceva[®]

(erlotinib), y análogos. A modo de ejemplo y sin pretender quedar limitados por la teoría, el tratamiento con un anticuerpo anticanceroso o un anticuerpo anticanceroso conjugado a una toxina puede producir la muerte de las células cancerosas (p. ej., las células tumorales) lo que podría potenciar una respuesta inmunitaria mediada por CTLA-4, PD-1, PD-L1 o LAG-3. En un ejemplo de una modalidad, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo anticanceroso combinado con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1, simultánea o secuencialmente o cualquier combinación de estos, lo cual puede potenciar respuestas inmunitarias antitumorales por parte del huésped.

Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser contrarrestados por la desactivación de proteínas, que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras el TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y el ligando Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). En otro ejemplo, se pueden combinar además anticuerpos para cada una de estas entidades con una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y

favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales por parte del huésped.

Otros anticuerpos que se pueden utilizar para activar la capacidad de respuesta inmunitaria del huésped se pueden utilizar además combinados con una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de CD y la presentación de antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 (Ridge *et al.*, *supra*) se pueden utilizar junto con una combinación de anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 (Ito *et al.*, *supra*). Otros anticuerpos activadores de moléculas coestimuladoras de linfocitos T (Weinberg *et al.*, *supra*, Melero *et al.* *supra*, Hutloff *et al.*, *supra*) pueden proporcionar además niveles incrementados de activación de linfocitos T.

Como se indicó anteriormente, el trasplante de médula ósea se está utilizando actualmente para tratar una diversidad de tumores de origen hematopoyético. Puede utilizarse un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos para tumores injertados en el donante.

Varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos para el antígeno y la transferencia adoptiva de estos linfocitos a los destinatarios para identificar

linfocitos T contra el tumor específicos para el antígeno (Greenberg & Riddell, *supra*). Estos métodos pueden utilizarse también para activar las respuestas de linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. Cabe esperar que la activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 aumente la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer) con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 a un sujeto. Por ejemplo, los métodos de la presente invención proporcionan un método para reducir la frecuencia de la colitis o diarrea inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores mediante la administración de un esteroide no absorbible al paciente. Debido a que cualquier paciente que recibe un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador corre el riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por el anticuerpo, esta población entera de pacientes es adecuada para terapia de acuerdo con los métodos de la presente invención. Aunque se han administrado esteroides para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y prevenir las exacerbaciones de la EII,

estos no se han utilizado para prevenir (reducir la aparición de) la EII en pacientes que no han sido diagnosticados de EII. Los efectos secundarios significativos asociados con esteroides, incluso esteroides no absorbibles, han hecho que
5 se desaconseje su uso profiláctico.

En otras modalidades, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 blockade (es decir, anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 terapéuticos inmunoestimuladores) se
10 pueden combinar además con el uso de un esteroide no absorbible cualquiera. Como se utiliza en la presente, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que exhibe un metabolismo extenso de primer paso de tal manera que, después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del
15 esteroide es baja, es decir, menor de aproximadamente el 20%. En una modalidad de la invención, el esteroide no absorbible es budesónida. La budesónida es un glucocorticosteroide de acción local, que se metaboliza extensamente, fundamentalmente en el hígado, tras su administración oral. ENTOCORT EC®
20 (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesónida dependiente del pH y del tiempo desarrollada para optimizar el suministro de fármacos al íleon y a lo largo del colon. ENTOCORT EC® está autorizado en los Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada
25 relacionada con el íleon y/o el colon ascendente. La dosis

oral habitual de ENTOCORT EC[®] para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC[®] se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT EC[®] es metabolizado extensamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado para dar metabolitos con una actividad glucocorticoide insignificante. Así pues, la biodisponibilidad es baja (aproximadamente del 10%). La baja biodisponibilidad de la budesónida da como resultado una proporción terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides con metabolismo de primer paso menos extenso. La budesónida da lugar a menos efectos adversos, incluida una menor supresión hipotalámico-hipofisaria, que los corticosteroides de acción sistémica. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC[®] puede dar lugar a efectos glucocorticoides sistémicos tales como hipercorticismismo y supresión adrenal. Véase PDR 58.^a ed. 2004; 608-610.

En otras modalidades más, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 (es decir, anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 terapéuticos inmunoestimuladores) junto con un esteroide no absorbible se pueden combinar además con un salicitalo. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE[®], Pharmacia & UpJohn);

olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire EE. UU.; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

5 De acuerdo con los métodos de la presente invención, un salicilato administrado combinado con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier administración superpuesta o secuencial del salicilato y el esteroide no absorbible con el
10 objetivo de reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimulantes. Así pues, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores de acuerdo con la presente invención engloban la administración de un salicilato y un
15 esteroide no absorbible simultánea o secuencialmente (p. ej., se administra un salicilato 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de estos. Además, de acuerdo con la presente invención, se pueden administrar un salicilato y un esteroide no absorbible por la misma vía (p. ej., se
20 administran ambos por vía oral) o por vías diferentes (p. ej., se administra un salicilato por vía oral y se administra un esteroide no absorbible por vía rectal), que pueden diferir de la o las vías utilizadas para administrar los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

25 La presente divulgación se ilustra además mediante

los siguientes ejemplos, los cuales no se deben interpretar como limitantes. El contenido de todas las figuras y todas las referencias, secuencias de Genbank, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas en toda esta solicitud se
5 incorporan expresamente a la presente por referencia. En particular, las divulgaciones de las publicaciones PCT WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546 y WO 09/054863 se incorporan expresamente a la presente por referencia.

Ejemplo 1

10 Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra la LAG-3

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

Antígenos

15 Las proteínas de fusión LAG-3 recombinantes humanas se utilizaron como inmunógeno para generar anticuerpos anti-LAG-3 humanos. En ciertas inmunizaciones, se utilizó como inmunógeno una proteína de fusión que comprendía la región extracelular completa (dominios 1-4) de la LAG-3 humana
20 fusionada a un dominio Fc de inmunoglobulina humana (R&D Systems, # de catálogo 2319-L3) (D1-D4 hFc) o a un dominio Fc de inmunoglobulina de ratón (D1-D4 mFc). Para otras inmunizaciones, se utilizó como inmunógeno una proteína de fusión que comprendía solo los dos primeros dominios
25 extracelulares de la LAG-3 humana fusionada con un dominio Fc

de inmunoglobulina de ratón (D1-D2 mFc). Las proteínas de fusión LAG-3 se prepararon utilizando técnicas estándares de recombinación de ADN.

Razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ de ratones

5 transcromosómicos transgénicos

Se preparon anticuerpos monoclonales completamente humanos contra la LAG-3 humana utilizando las razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ de ratones transcromosómicos transgénicos, que expresan genes de anticuerpos humanos.

10 En la raza KM Mouse™, se ha alterado homocigóticamente el gen de la cadena ligera kappa endógena de ratón como se describe en Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12:811-820 y se ha alterado homocigóticamente el gen de la cadena pesada de ratón endógeno como se describe en el Ejemplo 1 de
15 la Publicación PCT WO 01/09187. Además, esta raza de ratón porta un transgen de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al., *supra*. La raza también contiene el transcromosoma SC20, que porta el locus de la cadena pesada de la Ig humana, como se describe en la
20 Publicación PCT WO 02/43478. La raza KM/FCGR2D Mouse™ es la misma que la raza KM Mouse™ salvo que su genoma también comprende una alteración homocigótica del gen Fc γ RIIB endógeno. Las razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ también se describen detalladamente en la Publicación de la Solicitud de
25 EE. UU. N.º 20020199213.

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

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos de la LAG-3, se inmunizaron ratones de las razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ con una de las tres proteínas de fusión LAG-3 recombinantes diferentes descritas anteriormente (D1-D4 hFc, D1-D4 mFc, D1-D2, mFc). Los esquemas de inmunización general se describen en Lonberg et al. (1994) *supra*; Fishwild et al., *supra* y la Publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían una edad de 6-16 semanas en el momento de la primera infusión de antígeno. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal (IP) y/o subcutánea (SC). Los ratones se inmunizaron cuatro veces cada dos semanas con 10 µg de la proteína de fusión LAG-3 recombinante, seguida de dos inmunizaciones con 20 µg del mismo inmunógeno en Ribi como adyuvante. La respuesta inmunitaria se monitorizó mediante extracciones de sangre retroorbitales. El plasma se cribó por ELISA (como se describe más adelante) y se utilizaron para las fusiones ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-LAG-3. Antes de sacrificar los ratones y extirpar sus bazo, se estimularon por vía intravenosa e intraperitoneal con 20 µg de antígeno, seguidos de una estimulación intravenosa posterior con 20 µg de antígeno.

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

Para seleccionar ratones que producían anticuerpos

que se unían a la proteína LAG-3, se analizaron sueros de ratones inmunizados con la proteína de fusión D1-D4 hFc por un ELISA modificado como se describe originariamente en Fishwild *et al.* (1996). Resumiendo, se cubrieron placas de microtítulos con proteína de fusión LAG-3 recombinante purificada con densidad de 1 µg/ml en PBS, 50 µl/pocillos incubados a 4°C durante la noche, posteriormente se bloquearon con 200 µl/pocillo de BSA al 5% en PBS. Se añadieron diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con LAG-3 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron posteriormente con un anticuerpo policlonal de cabra anti-cadena ligera kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron con sustrato ABTS y se analizaron por espectrofotometría con DO 405.

Para ratones inmunizados con proteínas de fusión D1-D4 mFc o D1-D2 mFc, se analizaron sueros de estos ratones por ELISA indirecto utilizando anti-Ig de ratón de cabra para cubrir las placas durante una hora antes de cubirlas con el antígeno para eliminar la unión no específica a la parte Fc de ratón. Posteriormente se llevaron a cabo los mismos pasos de ELISA que se describieron anteriormente.

Los ratones que desarrollaron los títulos más elevados de anticuerpos anti-LAG-3 se utilizaron para las

fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe a continuación y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para determinar la actividad anti-LAG-3 por ELISA.

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

Los esplenocitos de ratón, aislados de ratones KM o KM/FCGR2D, se fusionaron por electrofusión basada en un campo eléctrico utilizando un electroporador de fusión con eliminación selectiva Cyto Pulse de cámara grande (Cyto Pulse
10 Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) de una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se cribaron posteriormente según su producción de anticuerpos específicos para el antígeno. Se fusionaron suspensiones celulares simples de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto
15 del número de células P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) de células de mieloma de ratón no secretoras. Las células se colocaron con una densidad de aproximadamente 1×10^5 /pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en un medio
20 selectivo que contenía suero fetal bovino al 10% complementado con origen (IGEN) en RPMI, L-glutamina, piruvato sódico, HEPES, penicilina, estreptamicina, gentamicina, 1x HAT y β -mercaptoetanol. Después de 1-2 semanas, se cultivaron las células en un medio en el cual se había reemplazado el HAT por
25 HT. Posteriormente, se cribaron los pocillos individuales por

ELISA (descrito anteriormente) según su contenido en anticuerpos anti-LAG-3 IgG monoclonales humanos. Una vez que se produjo un crecimiento extenso del hibridoma, se monitorizó el medio normalmente al cabo de 10-14 días. Los hibridomas
5 secretores de anticuerpos se colocaron de nuevo en las placas, se cribaron de nuevo y, en caso de ser todavía positivos para la IgG humana, se subclonaron los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron posteriormente *in vitro* para
10 generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su posterior caracterización.

Se seleccionaron clones de hibridomas de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 para análisis y secuenciación posteriores.

15

Ejemplo 2

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

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de mAb expresadas por
20 los clones de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 descritos en el Ejemplo 1, se secuenciaron utilizando el siguiente protocolo. El ARN total se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). El ADNc se preparó mediante el protocolo 5'-RACE con el
25 kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech

Laboratories, Inc., Mountain View, CA) y transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las regiones V de cada anticuerpo se amplificaron utilizando un cebador de la región constante específico para 3' humano, apareado con la
5 mezcla de cebador universal 5' RACE. Los productos de PCR que contenían las regiones V se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en cepas de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se preparon las muestras de ADN miniprep o Templiphi (GE Healthcare
10 Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se sometieron a secuenciación de ADN (Sequetech, Mountain View, CA). Las secuencias de ADN resultantes se analizaron para determinar sus redistribuciones en fase y otras características de los anticuerpos. Las proteínas expresadas se caracterizaron por
15 análisis químicos de proteínas estándar. Se detectó que los clones de 25E3, 25F7 y 26H10 expresaban un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG1, mientras que se detectó que los clones de 8B7 y 17E5 expresaban un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y
20 una cadena ligera kappa de IgG4 y se detectó que el clon de 11F2 expresaba un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG2.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 25F7 se muestran en la
25 Figura 1A y en SEQ ID NO: 49 y 37, respectivamente. Las

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

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 26H10 se muestran en la Figura 2A y en SEQ ID NO: 50 y 38, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable

5 de la cadena ligera de 26H10 se muestran en la Figura 2B y en SEQ ID NO: 56 y 44, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 26H10 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 9) demostró que la

10 cadena pesada de 26H10 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33 (SEQ ID NO:65) y un segmento J_H de la línea germinal humana J_H 6B (SEQ ID NO:66). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 26H10 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se

15 obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 2A y en SEQ ID NOs: 2, 8 y 14, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 26H10 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea

20 germinal humana conocidas (Figura 10) demostró que la cadena ligera kappa de 26H10 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K A27 (SEQ ID NO:67) y un segmento J_K de la línea germinal humana J_K 3 (SEQ ID NO:68). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 26H10 utilizando el

25 sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se

obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 2B y en SEQ ID NOs: 20, 26 y 32, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la
5 región variable de la cadena pesada de 25E3 se muestran en la
Figura 3A y en SEQ ID NO: 51 y 39, respectivamente. Las
secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable
de la cadena ligera de 25E3 se muestran en la Figura 3B y en
SEQ ID NO: 57 y 45, respectivamente. La comparación de la
10 secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 25E3 con
las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la
línea germinal humana conocidas (Figura 11) demostró que la
cadena pesada de 25E3 utiliza un segmento V_H de la línea
germinal humana V_H 3-20 (SEQ ID NO:69) y un segmento J_H de la
15 línea germinal humana J_H 4b (SEQ ID NO:70). Mediante el
análisis posterior de la secuencia V_H de 25E3 utilizando el
sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se
obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la
cadena pesada como se muestra en la Figura 3A y en SEQ ID NOs:
20 3, 9 y GGY, respectivamente. La comparación de la secuencia de
inmunoglobulina de la cadena ligera de 25E3 con las secuencias
de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal
humana conocidas (Figura 12) demostró que la cadena ligera
kappa de 25E3 utiliza un segmento V_K de la línea germinal
25 humana V_K L18 (SEQ ID NO:71) y un segmento J_K de la línea

germinal humana JK 2 (SEQ ID NO:64). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 25E3 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 3B y en SEQ ID NOs: 21, 27 y 33, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 8B7 se muestran en la Figura 4A y en SEQ ID NO: 52 y 40, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 8B7 se muestran en la Figura 4B y en SEQ ID NO: 58 y 46, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 8B7 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 13) demostró que la cadena pesada de 8B7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 4-34 (SEQ ID NO:61) y un segmento J_H de la línea germinal humana J_H 5B (SEQ ID NO:62). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 8B7 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 4A y en SEQ ID NOs: 4, 10 y 16, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 8B7 (Figura 14) con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea

germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera kappa de 8B7 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 4 (SEQ ID NO:72). Mediante el análisis posterior de la
5 secuencia V_K de 26H10 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 4B y en SEQ ID NOs: 22, 28 y 34, respectivamente.

10 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 11F2 se muestran en la Figura 5A y en SEQ ID NO: 53 y 41, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 11F2 se muestran en la Figura 5B y en
15 SEQ ID NO: 59 y 47, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 11F2 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 15) demostró que la cadena pesada de 11F2 utiliza un segmento V_H de la línea
20 germinal humana V_H 1-24 (SEQ ID NO:73), un segmento D de la línea germinal humana 2-15 y un segmento J_H de la línea germinal humana JH 4B (SEQ ID NO:70). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 11F2 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la
25 delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena

pesada como se muestra en la Figura 13A y en SEQ ID NOs: 5, 11 y 17, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 11F2 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 16) demostró que la cadena ligera kappa de 11F2 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 1 (SEQ ID NO:74). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 11F2 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 5B y en SEQ ID NOs: 23, 29 y 35, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 17E5 se muestran en la Figura 6A y en SEQ ID NO: 54 y 42, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 17E5 se muestran en la Figura 6B y en SEQ ID NO: 60 y 48, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 17E5 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 17) demostró que la cadena pesada de 17E5 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33 (SEQ ID NO:65), un segmento D de la línea germinal humana 2-2 y un segmento J_H de la línea

germinal humana JH 4B (SEQ ID NO:70). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 17E5 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 6A y en SEQ ID NOs: 6, 12 y 18, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 17E5 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 18) demostró que la cadena ligera kappa de 17E5 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 5 (SEQ ID NO:75). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 17E5 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 6B y en SEQ ID NOs: 24, 30 y 36, respectivamente.

Las regiones variables de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se pueden convertir en anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo deseado utilizando técnicas de recombinación de ADN estándares. Por ejemplo, las regiones V_H y V_L que codifican ADN se pueden clonar en un vector de expresión que porta las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de forma que las regiones variables estén operativamente enlazadas a las regiones constantes. Como

alternativa, se pueden utilizar vectores separados para la expresión de la cadena pesada de longitud completa y de la cadena ligera de longitud completa. Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión adecuados para usar en la creación de anticuerpos de longitud completa incluyen los vectores pIE descritos en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20050153394.

Ejemplo 3

Caracterización de las propiedades de unión de los anticuerpos

10 monoclonales LAG-3

En este ejemplo, se examinó la unión de anticuerpos anti-LAG-3 humanos a la LAG-3 de la superficie celular (LAG-3 humana, de mono y de ratón) por citometría de flujo. Además, se analizó la cinética de la unión a la LAG-3 mediante un análisis BIACORE. Es más, el mapeo de los epítomos se llevó a cabo utilizando un experimento de escaneo peptídico.

A. Estudios por citometría de flujo

1. Unión de células CHO-LAG-3 humana

Para analizar la capacidad de los anticuerpos de unirse a la proteína LAG-3 de la superficie celular, se incubaron los anticuerpos con una línea celular CHO que había sido transfectada para expresar la LAG-3 humana en la superficie celular. Los anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se diluyeron en serie con 1x tampón PFAE frío (1x PBS + 2% de FBS, 0.02% de azida de

sodio, Na EDTA 2mM). Para la reacción de unión, se añadieron 50 μ l de solución de anticuerpo diluido a 50 μ l de suspensión celular que contenía 2×10^5 células y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 1x tampón PFAE. Se añadió una dilución 1:100 de anticuerpo de cabra anti-cadena ligera kappa humana marcado con FITC (Bethyl Laboratories, Inc., # de Cat. A80-115F) y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C, seguido de dos lavados con 1x tampón PFAE frío. Tras el último lavado, se añadieron 150 μ l de 1x PFAE frío que contenía 10 μ g/mL de yoduro de propidio (Roche Applied Science, # de Cat. 1_348_639) a cada solución y se realizó un análisis de la unión de anticuerpo por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (BD Bioscience).

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

Tabla 1

Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a células CHO que expresaban

LAG-3 humana

| <u>Anticuerpo</u> | <u>CE₅₀ (nM)</u> |
|-------------------|-----------------------------|
| 25F7 | 0.45 - 2.52 |
| 8B7 | 1.93 - 4.44 |
| 26H10 | 1.81 - 3.64 |
| 11F2 | 15.12 |
| 25E3 | 14.9 - 25.39 |
| 17E5 | 12.3 |

2. Unión de linfocitos T CD4⁺ activados humanos

Para analizar la capacidad de los anticuerpos de unirse a la LAG-3 humana natural en la superficie de linfocitos T activados humanos, se aislaron linfocitos T CD4⁺ en reposo de células sanguíneas mononucleares periféricas purificadas y se sometieron a tres días de estimulación con una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 fijados a microesferas de poliestireno. Los anticuerpos monoclonales 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie con 1x tampón PFAE frío (1x PBS + 2% de FBS, 0.02% de azida de sodio, Na EDTA 2mM). Para la reacción de unión, se mezclaron 50 µl de la solución de anticuerpo diluido con 50 µl de anti-CD4 humano marcado con PE (BD Bioscience, # de Cat. 555347). Se procesaron los linfocitos T activados mediante el mismo

protocolo descrito anteriormente. El análisis de la unión de anticuerpo se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Los resultados del análisis por citometría de flujo se resumen a continuación en la Tabla 2, que muestra las CE₅₀ para la unión a los linfocitos T CD4⁺ T humanos activados, lo que demuestra que los tres anticuerpos se unen de forma similar a la LAG-3 de la superficie celular humana.

Tabla 2

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

| <u>Anticuerpo</u> | <u>CE₅₀ (nM)</u> |
|-------------------|-----------------------------|
| 25F7 | 0.27 - 0.45 |
| 26H10 | 0.41 - 0.84 |
| 8B7 | 0.69 - 1.80 |

3. Unión de antígeno LAG-3 de mono

Para determinar si los anticuerpos anti-LAG-3 presentan reactividad cruzada con la LAG-3 de mono, se clonó una secuencia de ADNc por RT-PCR a partir de un preparado de ADNc combinado preparado por transcripción inversa de ARN de una serie de muestras de tejido de monos cynomolgus y rhesus. La secuencia se amplificó primero a partir del ADNc combinado utilizando cebadores (cebador directo 5': 5Mcyn1408; 5'-atgtgggaggctcagttcctg-3' (SEQ ID NO: 91) y cebador inverso 3': 3Mcyn1408a; 5'-gtcagagctgctccggctc-3' (SEQ ID NO: 92))

utilizando un sistema de amplificación por PCR GC-rich (Roche) y se clonó en un vector de clonación TOPO receptor (Invitrogen) para el análisis de secuencias. Posteriormente, se reamplificaron clones concordantes con la secuencia de referencia de la LAG-3 de mono rhesus de Genbank (N.º de acceso en Genbank XM_001108923) a partir del vector de clonación de ADN TOPO utilizando un segundo grupo de cebadores que incorporaban los sitios de restricción enzimática para la clonación direccional en un vector de expresión de células de mamífero.

El clon pa23-5 de la LAG-3 de mono se aisló y se secuenció. La secuencia de mono aislada presentaba un 99.6% de identidad con la secuencia de referencia de la LAG-3 de mono rhesus de Genbank. Se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos del clon pa23-3 de ADNc (SEQ ID NO: 93) con la LAG-3 de mono rhesus (SEQ ID NO: 94) de Genbank (con N.º de acceso XM_001108923) en la Figura 19. Las dos secuencias son idénticas salvo por un aminoácido diferente en la posición 419 (arginina en el clon pa23-5 frente a treonina en la secuencia de rhesus de Genbank) y a partir de esto se concluye que el clon pa23-5 de ADNc representa la secuencia genética de la LAG-3 de rhesus.

El clon pa23-5 de ADNc se insertó en un constructo de expresión, que se transfirió en células en suspensión CHO-S por nucleofección (Amaxa). La expresión de la LAG-3 de rhesus

por parte de clones resistentes a fármacos seleccionados y clasificados se confirmó mediante un análisis FACS. Esta línea celular CHO clonal que sobreexpresa la LAG_3 de rhesus se utilizó en ensayos FACS similares a los que se describieron
5 anteriormente para medir la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos a la proteína de mono. En resumen, los anticuerpos monoclonales 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie con 1x tampón PFAE frío (1x PBS + 2% de FBS, 0.02% de azida de sodio, Na EDTA 2mM). Para la reacción de unión, se
10 añadieron 50 µl de solución de anticuerpo diluido a 50 µl de suspensión celular que contenía 2×10^5 células y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Se procesaron las células mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. El análisis de la unión de anticuerpo se llevó a cabo como se
15 describió anteriormente.

En un experimento separado, se analizaron los anticuerpos para determinar la unión a la LAG-3 de mono cynomolgus utilizando linfocitos T de mono cynomolgus activados. La activación *in vitro* de estos linfocitos T de
20 mono se consiguió mediante tratamiento con anti-CD3/anti-CD28 de linfocitos T mediante esencialmente el mismo protocolo descrito anteriormente para la activación *in vitro* de linfocitos T humanos, seguido de un análisis por citometría de flujo realizado como se describió anteriormente para teñir
25 linfocitos T CD4⁺ humanos activados *in vitro*.

Los resultados de los análisis por citometría de flujo utilizando las células CHO-LAG-3 de rhesus y los linfocitos T de cynomolgus activados se resumen a continuación en la Tabla 3, que muestra las CE₅₀ para la unión a los dos tipos diferentes de células que expresan la LAG-3 de mono. Estos resultados demostraron que todos los anticuerpos se unen eficazmente tanto a la LAG-3 en los linfocitos T de cynomolgus activados como a la LAG-3 de rhesus (SEQ ID NO: 93) transfectada en células CHO. Sin embargo, existe una jerarquía de afinidades de unión, donde el clon de 26H10 muestra la afinidad más alta, que es aproximadamente 2.5 y 6 veces mejor que la de los clones de 8B7 y 25F7, respectivamente. La diferencia en la jerarquía de unión entre los dos tipos de células puede reflejar diferencias en las secuencias de aminoácidos entre las proteínas LAG-3 de rhesus y de cynomolgus.

Tabla 3

Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a la LAG-3 de mono

20

25

| <u>Anticuerpo</u> | <u>CE₅₀ de linfocitos T</u> | <u>CE₅₀ de CHO-LAG-3 de rhesus (nM)</u> |
|-------------------|---|--|
| | <u>CD4⁺ de cyno activados (nM)</u> | |
| 26H10 | 5.19 | 4.684 |
| 25F7 | 14.18 | 22.72 |
| 8B7 | 30.45 | 10.01 |

4. Unión de antígeno LAG-3 de ratón

Para determinar si los anticuerpos presentaban reactividad cruzada con la LAG-3 de ratón, se realizaron estudios por citometría de flujo similares a los descritos anteriormente utilizando como célula diana una línea celular de hibridoma de linfocito T de ratón (3A9) que había sido transfectada para expresar la LAG-3 de ratón en su superficie celular, seguidos de un análisis FACS para detectar la unión de anticuerpo. Los resultados indicaron que, a diferencia de un anticuerpo de control anti-LAG-3 de ratón de control que presentaba una fuerte tinción, ninguno de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7 ó 26H10 humanos presentó una unión por encima de los niveles de fondo a la LAG-3 de ratón de la superficie celular, lo que demostró que ninguno de estos anticuerpos presentaba reactividad cruzada con la LAG-3 de ratón.

B. Análisis BIAcore

La unión de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 a la proteína LAG-3 recombinante se examinó por BIAcore™ utilizando un método de captura. Cada uno de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 se capturaron utilizando anti-CH1, un anticuerpo reactivo que es específico para la región constante 1 de la cadena pesada de anticuerpo humano (Zymed, Clon HP6045, conc. patrón 1.0 mg/mL). El anti-CH1 se cubrió con un chip CM5 (BR-1000-14,

grado de investigación) con una densidad alta (9700-11500RUs). El recubrimiento se llevó a cabo según el procedimiento de inmovilización estándar recomendado por el fabricante. El anticuerpo 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 ó 17E5
5 purificado, con concentraciones en el intervalo de 0.5-3 µg/mL, se capturó posteriormente en la superficie recubierta anti-CH1 con una velocidad de flujo de 10 µL/min durante 1 minuto. Se inyectó una única concentración de la proteína de fusión LAG-3 humana (20 nM) sobre el anticuerpo capturado
10 durante 3 minutos con una velocidad de flujo 25 µg/mL. Se dejó que el antígeno se disociara durante 7.5 minutos. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo con 25 µL de NaOH 25 mM, seguido de 30 µL de lavado con HBS-EP. Los controles isotípicos se analizaron en el chip y los datos se
15 emplearon para restar la unión no específica. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un equipo de resonancia de plasmones superficiales Biacore 3000, utilizando un software BIAcore Control v 3.2. Se llevó a cabo un análisis de datos utilizando un software BiaEvaluation v3.2. Los
20 resultados se muestran en la Tabla 4 siguiente. Los resultados de BIAcore para 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 confirman los resultados de citometría de flujo de los cinco anticuerpos, todos ellos son capaces de unirse con alta afinidad a la LAG-3 humana.

Tabla 4

Cinética de unión de anticuerpos anti-LAG-3 a la LAG-3 humana
recombinante

5

| <u>Anticuerpo</u> | <u>K_D x 10⁻⁹ (M)</u> |
|-------------------|--|
| 25E3 | 0.09 |
| 8B7 | 0.09 |
| 26H10 | 0.10 |
| 25F7 | 0.47 |
| 17E5 | 4.53 |

10

C. Mapeo de epítomos

En la proteína LAG-3, el primer domino similar a inmunoglobulina de la región extracelular contiene un "bucle extra" expuesto que posee la secuencia de aminoácidos:

15 GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 79). Para examinar la unión de 25E3, 25F7, 8B7 y 26H10 a esta región de la LAG-3, y mapear el epítopo al que se une cada anticuerpo, se realizó un experimento de escaneo peptídico a lo largo de esta región. Se preparó una serie de 10 péptidos solapados que se escaneaban

20 a lo largo de la longitud completa de la secuencia del bucle extra y se conjugó con biotina. Para el análisis ELISA, se utilizaron placas de microtitulación recubiertas previamente con estreptavidina (Sigma-Aldrich, # de Cat. M5432) para capturar los conjugados de péptidos del bucle biotinilados

25 aplicados en un volumen de 100 µl con una concentración de 2

µg/mL y se incubaron 18 horas a 4°C, después de lo cual las
placas se lavaron 3 veces y se bloquearon a temperatura
ambiente durante una hora con tampón de bloqueo (1x PBS + FBS
al 10%). A continuación, se aplicaron anticuerpos anti-LAG-3
5 humanos diluidos en serie 3 veces en tampón de bloqueo de 10
µg/mL y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante
2 horas y posteriormente se lavaron tres veces. Para detectar
el anticuerpo humano unido, se diluyó un anticuerpo de cabra
anti-cadena ligera kappa humana conjugado con HRP (Bethyl
10 Laboratories, # de Cat. A80-115P) hasta 1 µg/mL en tampón de
bloqueo y se aplicó a los pocillos de ensayo durante una hora,
seguido de tres lavados y la aplicación del sustrato TMB
(eBioscience, # de Cat. 00-4201-56). Se realizaron lecturas de
densidad óptica con una longitud de onda de 650 nm en un
15 espectrofotómetro Spectramax 340PC (Molecular Dynamics, Inc.).
Los resultados del experimento de escaneo peptídico se resumen
a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5
Unión de anticuerpos anti-LAG al escaner peptídico del bucle
extra de la LAG-3

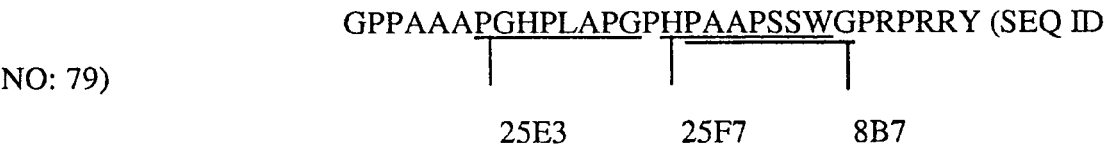
| | | | | | | |
|----|---|-------------------|------|-----|------|-------|
| | Escaner peptídicos del bucle extra de la LAG-3 | <u>SEQ</u> | | | | |
| | GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY | 79 | 25E3 | 8B7 | 25F7 | 26H10 |
| | GPPAAAPGHPLA | 80 | - | - | - | - |
| 25 | PAAAPGHPLAPG | 81 | ++ | - | - | - |

5

| Escaner peptídicos del bucle extra de la LAG-3 | SEQ | | | | |
|--|-----|----|----|----|---|
| AAPGHPLAPGPH | 82 | ++ | - | - | - |
| PGHPLAPGPHPA | 83 | + | - | - | - |
| HPLAPGPHPAAP | 84 | ± | - | - | - |
| LAPGPHPAAPSS | 85 | - | - | - | - |
| PGPHPAAPSSWG | 86 | - | ++ | ++ | - |
| PHPAAPSSWGPR | 87 | - | ++ | ++ | - |
| PAAPSSWGPRPR | 88 | - | ++ | + | - |
| APSSWGPRPRRY | 89 | - | - | - | - |

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

Las regiones identificadas en este estudio se subrayan en la secuencia del bucle extra de longitud completa:



25

Por lo tanto, los resultados del escáner peptídico indican que los anticuerpos 25E3, 25F7 y 8B7 se unen a epítomos diferentes, aunque próximos, en la LAG-3 humana.

Para examinar más detalladamente la unión de estos anticuerpos a la región del péptido bucle extra, se realizaron ensayos ELISA adicionales. En un ensayo ELISA utilizando el péptido bucle extra de longitud completa humano (SEQ ID NO: 79), se determinaron los valores de CE_{50} para la unión de 25E3, 25F7 y 8B7. Además, se realizó un ensayo peptídico ELISA similar utilizando la secuencia del péptido bucle extra de longitud completa de la LAG-3 de mono rhesus, que poseía la secuencia GPPAPAPGHPAPGHRPAAP YSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 90), y se determinaron los valores de CE_{50} para la unión de 25F7 y 8B7. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 6. Los resultados confirman que los anticuerpos 25E3, 25F7 y 8B7 son capaces de reconocer la región del péptido bucle extra de la LAG-3 humana. Es más, los anticuerpos 25F7 y 8B7 también se unen a la región del péptido bucle extra de la LAG-3 de rhesus, aunque su unión es peor si se compara con la secuencia humana, lo cual puede deberse a la divergencia de secuencias de especie en este polipéptido. Los resultados también confirman que el anticuerpo 26H10 no es capaz de reconocer el péptido bucle extra de la LAG-3.

Tabla 6

Unión de anticuerpos anti-LAG-3 al péptido bucle extra de la
LAG-3 humana y de rhesus

5

| <u>Anticuerpo</u> | <u>CE₅₀ del bucle</u>
<u>extra humano (nM)</u> | <u>CE₅₀ del bucle extra de</u>
<u>rhesus (nM)</u> |
|-------------------|--|---|
| 25E3 | 0.55 | No ensayado |
| 25F7 | 0.29-0.95 | 13.09 |
| 8B7 | 0.28-1.35 | 0.60 |
| 26H10 | No existe unión | No existe unión |

10

Ejemplo 4

Inhibición de la unión de la LAG-3 al MHC de clase II por mAb
anti-LAG-3

Para comprobar la capacidad de los anticuerpos anti-
15 LAG-3 de inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del MHC de
clase II, se realizó un ensayo de unión *in vitro* en el cual
una proteína de fusión LAG-3, que comprendía un dominio
extracelular de la LAG-3 humana fusionado a Fc de ratón (hLAG-
3-mIg), se hizo reaccionar con células Daudi, las cuales
20 expresan moléculas del MHC de clase II humano.

Para comprobar la inhibición por parte de los
anticuerpos de la unión de la LAG-3 al MHC de clase II, 25E3,
25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie a partir de 20 µg/mL
en tampón PFAE y a estas diluciones en serie se añadió 1 µg/ml
25 de proteína de fusión hLAG-3-mIg. Esta mezcla se incubó

durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de añadirla a 2x10⁵ células Daudi lavadas con 1x PFAE. La mezcla se aplicó a células Daudi y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se sedimentaron (3 minutos, 400 xg), se lavaron una vez con 1x tampón PFAE y se volvieron a sedimentar, y se detectó la unión de hLAG-3-mIg a las células Daudi utilizando un reactivo secundario anti-mIgG Fcy marcado con PE recombinante. El análisis de la unión LAG-3-mIg se llevó a cabo con el citómetro de flujo FACScalibur (BD Bioscience). Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 7, que muestra los valores de CI₅₀ en nM.

Tabla 7
Inhibición de la unión de la LAG-3 al MHC de clase II por parte de anticuerpos anti-LAG-3

| <u>Anticuerpo</u> | <u>CI₅₀ (nM)</u> |
|-------------------|-----------------------------|
| 25E3 | 0.8 - 6.78 |
| 25F7 | 0.12 - 0.92 |
| 8B7 | 0.19 - 0.95 |
| 26H10 | 0.10 |

Los resultados demuestran que los cuatro anticuerpos son eficaces en la inhibición de la unión de la LAG-3 a anticuerpos del MHC de clase II, donde 25F7, 8B7 y 26H10 presentan valores de CI₅₀ aproximadamente de 7 a 13 veces menores que los de 25E3.

Ejemplo 5

Estimulación de respuesta de linfocito T específica para un antígeno por parte de mAb anti-LAG-3

Para comprobar la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 para estimular una respuesta de linfocito T específica para un antígeno, se empleó un ensayo de estimulación peptídica de linfocitos T 3A9 (véanse, por ejemplo, Workman et al. (2003) *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman et al. (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263).

En este ensayo, se utilizó como linfocito T respondedor un hibridoma de linfocito T de ratón, 3A9, específico para el péptido HEL₄₈₋₆₂. El linfocito 3A9 T respondedor se transdujo retroviralmente para expresar la LAG-3 humana o la LAG-3 de ratón en su superficie celular. La célula presentadora de antígeno (APC) usada para presentar el péptido antigénico HEL₄₈₋₆₂ a las células 3A9 fue la línea celular LK35.2 positiva del MHC de clase II. Otros estudios indicaron que una proteína de fusión LAG-3 humana era capaz de unirse a moléculas del MHC de clase II de ratón, validando de este modo el uso de APC LK35.2 de ratón en este ensayo. La estimulación específica para un antígeno de las células 3A9 fue indicada por la producción de interleucina 2 (IL-2), cuya secreción se midió por ELISA (kit OptEIA de IL-2 de ratón, BD Bioscience, # de Cat. 555148 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante).

La expresión ectópica de la LAG-3 humana o de ratón en los linfocitos T 3A9, en ausencia de anticuerpos, produjo un efecto inhibitorio sobre las respuestas específicas para un antígeno cuando se incubaron los linfocitos T transfectados con las APC LK35.2 presentadoras del péptido antigénico HEL₄₈₋₆₂, como se indica por un aumento en la cantidad de péptido antigénico necesaria para estimular la producción de la IL-2 por parte de las células 3A9 en comparación con el perfil de respuesta-dosis de péptido de los linfocitos T 3A9 de control.

Para comprobar la estimulación de una respuesta de linfocitos T específica de un antígeno por parte de anticuerpos, las APC (2.5×10^4 células) se incubaron previamente con el péptido antigénico (200 nM) durante 30 minutos a 37°C y los linfocitos T 3A9 (5.0×10^4 células que expresan mLAG-3, hLAG-3 o células de control) se incubaron previamente con un anticuerpo anti-hLAG-3 (25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2, 17E5), se diluyeron con una dilución de tres veces en serie a partir de 25 µg/mL) durante 15 minutos a 37°C. Los linfocitos T 3A9 se añadieron posteriormente a las APC impulsadas por antígeno y el cultivo se incubó durante 24 horas a 37°C. El sobrenadante se recogió y se midió la producción de IL-2 de ratón. Los resultados para los linfocitos T 3A9 que expresaban la LAG-3 humana se presentan en la Tabla 8, que muestra los valores de CI₅₀ en nM.

Tabla 8

Estimulación de respuestas de linfocito T específicas para un antígeno por parte de anticuerpos anti-LAG-3

5

| <u>Anticuerpo</u> | <u>CI₅₀ del ensayo peptídico 3A9-hLAG-3 (nM)</u> |
|-------------------|---|
| 25F7 | 0.14 - 1.94 |
| 26H10 | 1.45 - 6.49 |
| 8B7 | 3.25 - 13.90 |
| 25E3 | 3.88 - 70.78 |
| 11F2 | 81.50 - 240 |
| 17E5 | No existe inhibición |

10

Los resultados muestran que los anticuerpos 25F7, 8B7 y 26H10, y 25E3 en un grado menor, fueron capaces de estimular la producción de IL-2 en un ensayo de respuestas de linfocito T específicas para un antígeno, mientras que el anticuerpo 11F2 presentaba una capacidad mínima de inhibición y el anticuerpo 17E5 no fue funcional en este ensayo. Ninguno de los anticuerpos alteró la producción de IL-2 medida por parte de los linfocitos T 3A9 de control o de células T 3A9 transfectadas con la proteína LAG-3 de ratón, lo que demostró la especificidad del efecto estimulatorio.

20

Ejemplo 6

Inhibición del crecimiento tumoral por parte de mAb anti-LAG-3 mAb, solo o combinado

25

Para comprobar la capacidad del anticuerpo anti-LAG-

3, solo o combinado con otro anticuerpo inmunoestimulador, de inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*, se utilizaron dos modelos diferentes de injerto tumoral de ratón singénico. El primer modelo utilizó células de fibrosarcoma SalN múmero. El segundo modelo utilizó la línea celular MC38 de cáncer de colon múmero.

En un primer experimento, se implantó cada ratón (raza A/J) con 2×10^6 células de fibrosarcoma SalN el día 0 y las células tumorales se dejaron crecer siete días. Los días 7, 10 y 12 posimplantación, se trataron los ratones con 10 mg/kg de mAb anti-LAG-3 solo (el mAb C9B7W de rata anti-LAG-3 de ratón; eBioscience, N.º de Cat. 14-2231), un anticuerpo anti-PD-L1 solo (un mAb 14D8 anti-PD-L1 de ratón), los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-L1 combinados o un anticuerpo isotópico IgG1 de control. El mAb 14D8 es un anticuerpo de rata anti-PD-L1 de ratón que ha sido quimerizado para contener la IgG1 de ratón y las regiones constantes kappa de ratón.

Se midieron los volúmenes tumorales en los ratones durante los 50 días posteriores a la implantación, y se determinaron la mediana y la media de los volúmenes tumorales. La media de la inhibición del crecimiento tumoral se calculó (sobre la base de un 0% de inhibición para el tratamiento con el anticuerpo isotópico IgG1 de control). Los resultados para el día 24 posimplantación se resumen a continuación en la Tabla 9:

Tabla 9
Media de la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de
tumor Sa1N

| <u>Día</u> | <u>IgG1</u> | <u>LAG-3</u> | <u>PD-L1</u> | <u>Combinación</u> |
|------------|-------------|--------------|--------------|--------------------|
| 24 | - | 68 | 74.9 | 95.8 |

Por lo tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-LAG3 solo o con el anticuerpo anti-PD-L1 solo, produjo la inhibición del crecimiento tumoral, mientras que la combinación de ambos anticuerpos produjo una inhibición incluso mayor del crecimiento tumoral. Respecto a los grupos de tratamiento, al final del experimento los resultados fueron una remisión total del tumor en 4 de los 10 ratones tratados con anti-LAG3 solo, mientras que únicamente se observó una remisión total del tumor en 1 de los 10 ratones tratados con el anticuerpo IgG1 de control. De forma análoga, se observó una remisión total del tumor en 4 de los 11 ratones tratados con anti-PD-L1 solo. El tratamiento de los ratones con la combinación de anti-LAG3 y anti-PD-L1 produjo una remisión total del tumor en 9 de 10 ratones; el resto de los ratones que seguían presentado el tumor tenían un tumor indolente que permaneció pequeño durante el estudio.

Dos estudios adicionales utilizaron ratones implantados con células de la línea celular MC38 de cáncer de colon múrido. En el primer experimento, se implantó cada ratón

C57Bl/6 con 2×10^6 células MC38 el día 0, y se trataron el día 7, 10 y 12 posimplantación con 200 µg/dosis de anti-LAG-3 solo (mAb C9B7W), anti-PD-1 solo (el mAb 4H2) o anti-LAG-3 y anti-PD-1 combinados. Se utilizó un anticuerpo isotípico IgG1
5 apareado, 400 µg/dosis, como control. El mAb 4H2 es un anticuerpo de rata anti-PD-1 de ratón que ha sido quimerizado para contener la IgG1de ratón y las regiones constantes kappa de ratón.

La media del volumen tumoral, la mediana del volumen
10 tumoral y el % de supervivencia se determinaron 80 días después de la implantación. Los resultados mostraron que la monoterapia con LAG-3 en este modelo tumoral (MC38) mostró una actividad mínima o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento tumoral y ninguno de los ratones tratados
15 sobrevivió el experimento. En cambio, la monoterapia con anti-PD-1 mostró una actividad significativa, con una remisión total del tumor en 4 de 10 ratones al final del experimento. Es más, de forma análoga a los resultados para el modelo SalN, la terapia combinada de anti-LAG-3 junto con anti-PD-1 fue más
20 eficaz que cualquiera de los tratamientos solos, con una remisión total del tumor en 7 de 8 ratones al final del experimento.

En un segundo experimento con el modelo MC38, se implantó cada ratón C57Bl/6 con 2×10^6 células MC38 el día 0,
25 y se trataron los días 5, 8 y 11 posimplantación con 200

µg/dosis de anticuerpo de ensayo y/o 400 µg/dosis de anticuerpo IgG de control, como sigue: (i) un anticuerpo anti-IgG1 de control; (ii) un mAb anti-LAG-3 (mAb C9B7W) junto con la IgG1 de control; (iii) un anticuerpo anti-PD-1 (4H2) con la
5 IgG1 de control; (iv) un anticuerpo anti-CTLA-4 (el mAb 9D9 de ratón anti-CTLA-4 de ratón) junto con la IgG1 de control; (v) el mAb anti-LAG-3 junto con el mAb anti-PD-1; o (vi) el mAb anti-LAG-3 junto con el mAb anti-CTLA-4. El mAb 9D9 es un anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón que se generó en un
10 ratón en el cual el CTLA-4 endógeno de ratón había sido desactivado.

La media del volumen tumoral, la mediana del volumen tumoral y el % de supervivencia se determinaron durante 100 días después de la implantación. Los resultados fueron
15 similares al primer experimento en que la monoterapia con LAG-3 mostró una actividad mínima o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento tumoral MC38 y ninguno de los ratones tratados sobrevivió el experimento. La monoterapia con CTLA-4 también mostró una actividad mínima o ninguna actividad
20 en la inhibición del crecimiento tumoral MC38 y ninguno de los ratones tratados sobrevivió el experimento. En cambio, la monoterapia con anti-PD-1 mostró de nuevo una actividad significativa, con una remisión total del tumor en 4 de 10 ratones al final del experimento. Es más, la terapia combinada
25 fue más eficaz que la monoterapia. Para los ratones tratados

con la combinación de anti-LAG-3 y anti-CTLA-4, se observó una remisión total del tumor en 3 de 10 ratones al final del experimento y, para los ratones tratados con la combinación de anti-LAG-3 y anti-PD-1, se observó una remisión total del tumor en 8 de 10 ratones al final del experimento.

Por lo tanto, los estudios de injertos de tumores in vivo descritos anteriormente mostraron que, para al menos algunos modelos tumorales, el tratamiento con anticuerpo anti-LAG solo producía una inhibición significativa del crecimiento tumoral in vivo. Es más, para modelos tumorales múltiples, la terapia combinada del anticuerpo anti-LAG-3 junto con el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-PD-L1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 producía una actividad antitumoral incluso mayor que únicamente la monoterapia.

Ejemplo 7

Promoción de la autoinmunidad en ratones NOD por inhibición por parte de mAb anti-LAG-3

Para comprobar la capacidad del anticuerpo anti-LAG-3 de estimular una respuesta inmunitaria, como se indica mediante el desarrollo de autoinmunidad, se utilizó el modelo de diabetes de ratón NOD. Se sabe que los ratones NOD son propensos a desarrollar la diabetes autoinmunitaria. La progresión de la diabetes se puede monitorizar en ratones NOD hembra midiendo la glucosa en suero. Así pues, se examinó el efecto del tratamiento con anti-LAG-3, solo o combinado con

cualquiera de los anticuerpos inmunoestimuladores, sobre el desarrollo de la diabetes en ratones NOD hembra.

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

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el bloqueo de la interacción de la LAG-3 con su receptor interfería con una señal inmunorreguladora negativa que permitía una actividad inmunológica mayor en los ratones NOD, y esta mayor actividad inmunológica en los ratones tratados con LAG-3 se podía potenciar por tratamiento combinado bien sea con el anticuerpo anti-PD-1 o anti-CTLA-4.

Ejemplo 8

Inmunohistoquímica utilizando mAb anti-LAG-3

En este experimento, se utilizaron anticuerpos anti-LAG-3 marcados fluorescentemente en los experimentos de

inmunohistoquímica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-LAG-3 humanos marcados con FITC: 25F7-FITC (F:P = 2.9; versión IgG1); 25F7-G4-FITC (F:P = 2.7; versión IgG4); 8B7-FITC (F:P = 2.6) y 26H10-FITC (F:P = 3.4). Se examinó un panel de tejidos linfoides, específicamente de amígdala (dos muestras), de bazo (dos muestras) y del timo (dos muestras), junto con tejido pituitario (cuatro muestras). También se utilizaron las células CHO transfectadas con LAG-3 como control. Se utilizaron secciones criostato fijadas con acetona. Las secciones se tiñeron con anticuerpo anti-LAG-3 marcado con FITC (0.2-5 µg/ml), seguido de la tinción con anticuerpo de conejo anti-FITC como anticuerpo puente y posteriormente se visulizaron utilizando el EnVision™+ System Kit de conejo (Dako EE. UU., Carpinteria, CA). Los resultados se resumen en la Tabla 10 siguiente:

Tabla 10
Inmunohistoquímica utilizando mAb anti-LAG-3

| <u>Tejido</u> | <u>25F7-FITC</u> | <u>25F7-G4-FITC</u> | <u>8B7-FITC</u> | <u>26H10-FITC</u> |
|-------------------|--|--|--|--|
| Células CHO/LAG-3 | +
(fuerte) | +
(fuerte) | +
(fuerte) | +
(fuerte) |
| Amígdala (n=2) | +
(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2) | +
(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2) | +
(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2) | +
(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2) |

5

10

| <u>Tejido</u> | <u>25F7-FITC</u> | <u>25F7-G4-FITC</u> | <u>8B7-FITC</u> | <u>26H10-FITC</u> |
|---------------------|--|--|--|--|
| Bazo
(n=2) | +(muy débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2) | +(muy débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2) | +(débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2) | +(muy débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2) |
| Timo
(n=2) | +(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2) | +(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2) | +(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2) | +(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2) |
| Pituitaria
(n=4) | +(fuerte; ocasional en la adenohipófisis, 3/4) | +(fuerte; ocasional en la adenohipófisis, 3/4) | - | +(fuerte; ocasional en la adenohipófisis, 3/4; moderada débil, rara 1/4) |

15 negativa

20

25

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

Como cabía esperar, la expresión LAG-3 se detectó en el panel del tejido linfoide. Además, dos de los tres anticuerpos anti-LAG-3 examinados, 25F7 (versiones IgG1 y IgG4) y 26H10, exhibieron retención en el tejido pituitario, mientras que un anticuerpo examinado, 8B7, no mostró esta retención en el tejido pituitario. Por lo tanto, el experimento de inmunohistoquímica identificó dos subgrupos de anticuerpos anti-LAG-3, donde se retiene un subgrupo en el tejido pituitario y el otro subgrupo no se retiene en el tejido pituitario.

RESUMEN del LISTADO de SECUENCIAS

5

10

15

20

25

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>SECUENCIA</u> | <u>SEQ ID NO:</u> | <u>SECUENCIA</u> |
|-------------------|--------------------------------|-------------------|---|
| 1 | V _H CDR1 a.a. 25F7 | 49 | V _H n.t. 25F7 |
| 2 | V _H CDR1 a.a. 26H10 | 50 | V _H n.t. 26H10 |
| 3 | V _H CDR1 a.a. 25E3 | 51 | V _H n.t. 25E3 |
| 4 | V _H CDR1 a.a. 8B7 | 52 | V _H n.t. 8B7 |
| 5 | V _H CDR1 a.a. 11F2 | 53 | V _H n.t. 11F2 |
| 6 | V _H CDR1 a.a. 17E5 | 54 | V _H n.t. 17E5 |
| | | | |
| 7 | V _H CDR2 a.a. 25F7 | 55 | V _K n.t. 25F7 |
| 8 | V _H CDR2 a.a. 26H10 | 56 | V _K n.t. 26H10 |
| 9 | V _H CDR2 a.a. 25E3 | 57 | V _K n.t. 25E3 |
| 10 | V _H CDR2 a.a. 8B7 | 58 | V _K n.t. 8B7 |
| 11 | V _H CDR2 a.a. 11F2 | 59 | V _K n.t. 11F2 |
| 12 | V _H CDR2 a.a. 17E5 | 60 | V _K n.t. 17E5 |
| | | | |
| 13 | V _H CDR3 a.a. 25F7 | 61 | V _H 4-34 línea germinal a.a. |
| 14 | V _H CDR3 a.a. 26H10 | 62 | V _H JH5b línea germinal a.a. |
| 15 | PVGVV | 63 | V _K L6 línea germinal a.a. |
| 16 | V _H CDR3 a.a. 8B7 | 64 | V _K JK2 línea germinal a.a. |
| 17 | V _H CDR3 a.a. 11F2 | 65 | V _H 3-33 línea germinal a.a. |
| 18 | V _H CDR3 a.a. 17E5 | 66 | V _H JH5b línea germinal a.a. |

5

10

15

20

25

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>SECUENCIA</u> | <u>SEQ ID NO:</u> | <u>SECUENCIA</u> |
|-------------------|--------------------------------|-------------------|---|
| | | 67 | V _k A 27 línea germinal a.a. |
| 19 | V _H CDR1 a.a. 25F7 | 68 | V _K JK3 línea germinal a.a. |
| 20 | V _K CDR1 a.a. 26H10 | 69 | V _H 3-20 línea germinal a.a. |
| 21 | V _K CDR1 a.a. 25E3 | | |
| 22 | V _K CDR1 a.a. 8B7 | 70 | V _H JH5b línea germinal a.a. |
| 23 | V _K CDR1 a.a. 11F2 | 71 | V _K L-18 línea germinal a.a. |
| 24 | V _K CDR1 a.a. 17E5 | 72 | V _K JK4 línea germinal a.a. |
| | | 73 | V _H 1-24 línea germinal a.a. |
| 25 | V _K CDR2 a.a. 25F7 | 74 | V _K JK1 línea germinal a.a. |
| 26 | V _K CDR2 a.a. 26H10 | 75 | V _K JK5 línea germinal a.a. |
| 27 | V _K CDR2 a.a. 25E3 | | |
| 28 | V _K CDR2 a.a. 8B7 | 76 | PGHPLAPG |
| 29 | V _K CDR2 a.a. 11F2 | 77 | HPAAPSSW |
| 30 | V _K CDR2 a.a. 17E5 | 78 | PAAPSSWG |
| | | 79 | GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSW
GPRPRRY |
| 31 | V _K CDR3 a.a. 25F7 | 80 | GPPAAAPGHPLA |
| 32 | V _K CDR3 a.a. 26H10 | 81 | PAAAPGHPLAPG |
| 33 | V _K CDR3 a.a. 25E3 | 82 | AAPGHPLAPGPH |
| 34 | V _K CDR3 a.a. 8B7 | 83 | PGHPLAPGHPA |
| 35 | V _K CDR3 a.a. 11F2 | 84 | HPLAPGHPAAP |

5

10

15

20

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>SECUENCIA</u> | <u>SEQ ID NO:</u> | <u>SECUENCIA</u> |
|-------------------|-------------------------------|-------------------|--|
| 36 | V _K CDR3 a.a. 17E5 | 85 | LAPGPHPAAPSS |
| | | 86 | PGPHPAAPSSWG |
| 37 | V _H a.a. 25F7 | 87 | PHPAAPSSWGPR |
| 38 | V _H a.a. 26H10 | 88 | PAAPSSWGPRPR |
| 39 | V _H a.a. 25E3 | 89 | APSSWGPRPRRY |
| 40 | V _H a.a. 8B7 | 90 | GPPAPAPGHPPAPGHRPAA
PYSWGPRPRRY |
| 41 | V _H a.a. 11F2 | | |
| 42 | V _H a.a. 17E5 | 91 | atgtgggaggctcagttcctg |
| | | 92 | gtcagagctgctccggctc |
| 43 | V _K a.a. 25F7 | 93 | LAG-3 de rhesus clon
pa23-5 a.a. |
| 44 | V _K a.a. 26H10 | 94 | LAG-3 de rhesus a.a.
(XM_001108923) |
| 45 | V _K a.a. 25E3 | | |
| 46 | V _K a.a. 8B7 | | |
| 47 | V _K a.a. 11F2 | | |
| 48 | V _K a.a. 17E5 | | |

Reivindicaciones:

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo se une a la LAG-3 humana y presenta al menos una de las
5 siguientes propiedades:

(a) se une a la LAG-3 de mono;

(b) no se une a la LAG-3 de ratón;

(c) inhibe la unión de la LAG-3 a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II; y

10 (d) estimula una respuesta inmunitaria.

2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo presenta al menos dos de las propiedades (a), (b), (c) y (d).

3. El anticuerpo de conformidad con la
15 reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo presenta al menos tres de las propiedades (a), (b), (c) y (d).

4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo presenta las cuatro propiedades (a), (b), (c) y (d).

20 5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo estimula la producción de interleucina 2 (IL-2) en una respuesta de linfocito T específica para un antígeno.

6. El anticuerpo de conformidad con la
25 reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo estimula

una respuesta inmunitaria antitumoral.

7. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76).

8. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos HPAPPSSW (SEQ ID NO: 77) o PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78).

9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menor.

10. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menor.

11. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo tiñe el tejido pituitario por inmunohistoquímica.

12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo no tiñe el tejido pituitario por inmunohistoquímica.

13. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo presenta competencia cruzada por la unión a la LAG-3 humana

con un anticuerpo de referencia, donde el anticuerpo de referencia comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una
5 región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una
10 región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una
región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

15 (d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una
región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45;

(e) una región variable de la cadena pesada que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una
región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; o

(f) una región variable de la cadena pesada que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una
25 región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

14. El anticuerpo de conformidad de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo de referencia comprende:

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

15. El anticuerpo de conformidad de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo de referencia comprende:

 una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia
15 de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

16. El anticuerpo de conformidad de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo de referencia comprende:

 una región variable de la cadena pesada que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

17. El anticuerpo de conformidad de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo de
25 referencia comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

- 5 18. El anticuerpo de conformidad de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo de referencia comprende:

 una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una
10 región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

 19. El anticuerpo de conformidad de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo de referencia comprende:

- 15 una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

20. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción
20 de unión a antígeno de este, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano, un gen V_H 4-34 humano, un gen V_H 3-33 humano o un gen V_H 1-24 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

- 25 21. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción

de unión a antígeno de este, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano, un gen V_K L6 humano o un gen V_K A27 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

22. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 4-34 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano;

(b) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-33 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K A27 humano;

(c) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano;

(d) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-24 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano; o

(e) una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-33 humano y una región

variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano;

donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

5 23. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1;

10 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 7;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 13;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 19;

15 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 25; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31.

20 24. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2;

(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8;

25 (c) una CDR3 de la región variable de la cadena

pesada que comprende SEQ ID NO: 14;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 20;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena
5 ligera que comprende SEQ ID NO: 26; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 32.

25. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

10 (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 4;

(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena
15 pesada que comprende SEQ ID NO: 16;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 22;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 28; y

20 (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 34.

26. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena
25 pesada que comprende SEQ ID NO: 3;

(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 9;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende GGY;

5 (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 21;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 27; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena
10 ligera que comprende SEQ ID NO: 33.

27. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 5;

15 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 17;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena
20 ligera que comprende SEQ ID NO: 23;

(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 29; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

25 28. El anticuerpo de conformidad con la

reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 6;

5 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 12;

(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18;

(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 24;

10 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 30; y

(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 36.

29. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción
15 de unión a antígeno de este, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 37-42; y

(b) una región variable de la cadena ligera que
20 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 43-48;

donde el anticuerpo se une específicamente a la proteína LAG-3 humana.

30. El anticuerpo de conformidad con la
25 reivindicación 29, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43.

5 31. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y

10 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

32. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y

15 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

33. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque comprende:

20 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

34. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque comprende:

25 (a) una región variable de la cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

35. El anticuerpo de conformidad con la
5 reivindicación 29, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

10 36. Una composición caracterizada porque comprende el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de conformidad con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 37. Un inmunoconjugado caracterizado porque comprende el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de conformidad con la reivindicación 1 enlazado a un agente terapéutico.

20 38. Una composición caracterizada porque comprende el inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 37 y un portador farmacéuticamente aceptable.

39. El inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el agente terapéutico es una citotoxina.

25 40. Una composición caracterizada porque comprende el inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 39 y

un portador farmacéuticamente aceptable.

41. El inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el agente terapéutico es un isótopo radioactivo.

5 42. Una composición caracterizada porque comprende el inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 41 y un portador farmacéuticamente aceptable.

43. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada porque codifica el anticuerpo, o una porción de
10 unión a antígeno de este, de conformidad con la reivindicación 1.

44. Un vector de expresión caracterizado porque comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 43.

15 45. Una célula huésped caracterizada porque comprende el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 44.

46. Un método para preparar un anticuerpo anti-LAG-3 que comprende expresar el anticuerpo en la célula huésped de
20 conformidad con la reivindicación 45 y aislar el anticuerpo de la célula huésped.

47. Un método de estimulación de una respuesta de linfocito T específica para un antígeno caracterizado porque comprende poner el linfocito T en contacto con el anticuerpo
25 de conformidad con la reivindicación 1 de forma que se

estimule una respuesta de linfocito T específica para un antígeno.

48. El método de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque se estimula la producción de
5 interleucina 2 por parte del linfocito T específico para un antígeno.

49. Un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto caracterizado porque comprende administrar el anticuerpo de conformidad con la reivindicación
10 1 al sujeto de forma que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto.

50. El método de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque el sujeto es un sujeto que padece un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.

15 51. El método de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque el sujeto es un sujeto portador de un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

52. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto caracterizado porque comprende
20 administrar al sujeto el anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 de forma que se inhiba el crecimiento tumoral en el sujeto.

53. Un método para tratar una infección vírica en un sujeto caracterizado porque comprende administrar el
25 anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 al sujeto de

forma que se trate la infección vírica en el sujeto.

54. Un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto caracterizado porque comprende administrar un anticuerpo anti-LAG-3 al sujeto y al menos un
5 anticuerpo inmunoestimulador adicional de forma que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el anticuerpo inmunoestimulador adicional es un anticuerpo anti-PD-1.

10 56. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el anticuerpo inmunoestimulador adicional es un anticuerpo anti-PD-L1.

57. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el anticuerpo inmunoestimulador
15 adicional es un anticuerpo anti-CTLA-4.

58. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo humano.

59. El método de conformidad con la reivindicación
20 54, caracterizado porque el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo quimérico o humanizado.

60. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el anticuerpo inmunoestimulador adicional es un anticuerpo humano.

25 61. El método de conformidad con la reivindicación

54, caracterizado porque el anticuerpo inmunoestimulador adicional es un anticuerpo quimérico o humanizado.

62. Un método para preparar un anticuerpo anti-LAG-3 caracterizado porque comprende:

5 (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOS: 1-6, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOS: 7-12 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del
10 grupo conformado por SEQ ID NOS: 13-14, GGY y 16-18; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOS: 19-24, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOS: 25-30 y/o
15 una secuencia CDR3 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NOS: 31-36;

 (b) alterar al menos un residuo aminoacídico de la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de
20 la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y

 (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a la LAG-3 con alta afinidad, particularmente anticuerpos monoclonales humanos. Preferentemente, los anticuerpos se unen a la LAG-3 humana. En ciertas modalidades, los anticuerpos se unen tanto a la LAG-3 humana como a la LAG-3 de mono pero no se unen a la LAG-3 de ratón. La invención proporciona anticuerpos anti-LAG-3 que pueden inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del MHC de clase II y eso puede estimular respuestas de linfocito T específicas para un antígeno. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, vectores de expresión, células huésped y métodos para expresar los anticuerpos de la invención. Se proporcionan también inmunoconjugados, moléculas biespecíficas y composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de esta invención. Esta divulgación también proporciona métodos para detectar la LAG-3, así como también métodos para tratar por estimulación respuestas inmunitarias utilizando un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención. También se proporciona la terapia combinada, en la que un anticuerpo anti-LAG-3 se administra junto con al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional.

Anti-LAG3 25F7 VH

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 1A

2/26

Anti-LAG3 25F7 VK

segmento V : L6
segmento J : JK2

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 1B

Anti-LAG3 26H10 VH

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 2A

4/26

Anti- LAG3 26H10 VK

segmento V: A27
segmento J: JK3

```

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

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

                                CDR2
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

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

                                CDR3
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      Q   Y   G   S   S   P   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
```

FIGURA 2B

5/26

Anti-LAG3 25E3 VH

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

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

CDR 1

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

CDR 2

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

CDR 2

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

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

CDR 3

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

T V S S
 325 ACC GTC TCC TCA

FIGURA 3A

6/26

Anti-LAG3 25E3 VK

segmento V : L18
segmento J : JK2

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

CDR 1

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

CDR 2

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

CDR 2

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

CDR 3

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

CDR 3

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

FIGURA 3B

7/26

Anti-LAG3 8B7 VH

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 4A



8/26

Anti-LAG3 8B7 VK

segmento V : L6  
segmento J : JK4

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 4B

9/26

Anti- LAG3 11F2 VH

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

```

 T H D Q V Q L V Q S G A E V K K P G
1 ACC CAC GAC CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG

 CDR 1
 A S V K V S C K V S G Y T L T E V S
55 GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA GTA TCC

CDR 1 CDR 2
~~~~~                                     ~~~~~
      M   H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   M   G   G   F
109 ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGT TTT

                                         CDR 2
~~~~~
 D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T
163 GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC

 M T E D T S T D T A Y M E L S S L R
217 ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA

 CDR 3
~~~~~
      S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   T   A   F   V   V   V   V   A
271 TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA ACA GCC TTT GTA GTG GTG GTA GCT

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

FIGURA 5A

10/26

**Anti-LAG3 11F2 VK**

segmento V: L6  
segmento J: JK1

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

**CDR 1**

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

**CDR 2**

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

**CDR 2**

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

**CDR 3**

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

**CDR 3**

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

**FIGURA 5B**

11/26

**Anti-LAG3 17E5 VH**

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

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

**CDR 1**

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

**CDR 2**

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

**CDR 2**

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

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

**CDR 3**

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

**CDR 3**

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

**FIGURA 6A**

12/26

Anti-LAG3 17E5 VK

segmento V : L6  
segmento J : JK5

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 6B

Anti-LAG3 25F7 VH

CDR1  
4-34 línea germinal Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A  
V Y G G S F S G Y Y W S W  
25F7 VH - - - - -  
- - - - - D - - - N -

CDR2  
4-34 línea germinal I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y  
N P S L K S R V T I S V D  
25F7 VH - - - - - N - N - - S  
- - - - - L - L -

CDR3  
4-34 línea germinal T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C  
A R  
JH5b línea germinal  
N W F D  
25F7 VH - - - - - R - - - - -  
- F G Y S D Y E Y - - - -

JH5b línea germinal P W G Q G T L V T V S S  
25F7 VH - - - - - (JH5b)

FIGURA 7

Anti-LAG3 25F7 VK

CDR1  
L6 línea germinal E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C  
R A S Q S V S S  
25F7 VK - - - - -  
- - - - - I - -

CDR2  
L6 línea germinal Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R  
A T G I P A R F  
25F7 VK - - - - -  
- - - - -

CDR3  
L6 línea germinal S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V  
Y Y C Q Q R S N  
25F7 VK - - - - -  
- - - - -

L6 línea germinal W P  
JK2 línea germinal T F G Q G T K L E I K  
25F7 VK - - L - - - - - N - - - - (JK2)

FIGURA 8

Anti-LAG3 26H10 VH

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

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

CDR3  
3-33 línea germinal D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y  
Y C A R  
JH6b línea germinal  
Y G  
26H10 VH - - - - -  
- - - - E W A V A S W D - -

JH6b línea germinal M D V W G Q G T T V T V S S  
26H10 VH - - - - -

FIGURA 9



Anti-LAG3 26H10 VK

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

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

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

FIGURA 10

Anti-LAG3 25E3 VH

CDR1  
3-20 línea germinal E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A  
S G F T F D D Y G M S W  
25E3 VH - - - - -  
- - - - -

CDR2  
3-20 línea germinal V R Q A P G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y  
A D S V K G R F T I S R  
25E3 VH - - - - - Y -  
- - - - - G

CDR 3  
3-20 línea germinal D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y H C  
A R  
JH4b línea germinal  
Y W G Q G T L V  
25E3 VH - - - - - Y -  
T T G G - - - - -

JH4b línea germinal T V S S  
25E3 VH - - - - (JH4B)

FIGURA 11

Anti-LAG3 25E3 VK

CDR 1  
L18 línea germinal I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R  
A S Q G I S S  
25E3 VK1 - - - - -  
- - - - - R -

CDR 2  
L18 línea germinal A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E  
S G V P S R F  
25E3 VK1 - - - - -  
- - - - -

CDR 3  
L18 línea germinal S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y  
Y C Q Q F N S  
25E3 VK1 - - - - -  
- - - - -

CDR 3  
L18 línea germinal Y P  
JK2 línea germinal Y T F G Q G T K L E I K (JK2)

FIGURA 12

19/26

Anti-LAG3 8B7 VH

CDR1  
4-34 línea germinal Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C  
A V Y G G S F S G Y Y W S W  
8B7 VH - - - - -  
- - - - -

CDR2  
4-34 línea germinal I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N  
Y N P S L K S R V T I S V D  
8B7 VH - - - - - R - N - -  
C - - - - - G -

CDR3  
4-34 línea germinal T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y  
C A R G  
JH5b línea germinal  
D  
8B7 VH - - - K - - A - - - N - - - - -  
- - - - - E -

JH5b línea germinal P W G Q G T L V T V S S  
8B7 VH S - - P - - - - -

FIGURA 13

Anti-LAG3 8B7 VK

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

FIGURA 14

21/26

Anti-LAG3 11F2 VH

CDR1  
1-24 línea germinal (T H A)Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V  
K V S C K V S G Y T L T E L S M H W  
11F2.6 VH - - D - - - - - - - - - - - - - - -  
- - - - - - - - - - - V - - - -

CDR2  
1-24 línea germinal V R Q A P G K G L E W M G G F D P E D G E  
T I Y A Q K F Q G R V T M T E  
11F2.6 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  
- - - - - - - - - - - - - - -

CDR3  
1-24 línea germinal D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V  
Y Y C A T  
JH4b línea germinal  
D  
11F2.6 VH - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  
- - - - - A F V V V V A A S -

JH4b línea germinal Y W G Q G T L V T V S S  
11F2.6 VH - - - - - - - - - - - (JH4b)

Nótese que THA pertenece a la secuencia líder prevista de VH 1-24

FIGURA 15

Anti-LAG3 11F2 VK

CDR1  
L6 línea germinal      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T  
L S C R A S Q S V S S  
11F2.6 VK      - - - - -  
- - - - -

CDR2  
L6 línea germinal      Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A  
S N R A T G I P A R F  
11F2.6 VK      - - - - -  
- - - - -

CDR3  
L6 línea germinal      S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D  
F A V Y Y C Q Q R S N  
11F2.6 VK      - - - - -  
- - - - -

L6 línea germinal      W P  
JK1 línea germinal      W T F G Q G T K V E I K  
11F2.6 VK      - - - - - (JK1)

FIGURA 16

FIGURA 17



Anti-LAG3 17E5 VK

|                    |                                             |
|--------------------|---------------------------------------------|
| <u>CDR1</u>        |                                             |
| L6 línea germinal  | E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S |
| C R A S Q S V S S  |                                             |
| 17E5 VK            | - - - - -                                   |
| - - - - -          |                                             |
| <u>CDR2</u>        |                                             |
| L6 línea germinal  | Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N |
| R A T G I P A R F  |                                             |
| 17E5 VK            | - - - - -                                   |
| - - - - -          |                                             |
| <u>CDR3</u>        |                                             |
| L6 línea germinal  | S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A |
| V Y Y C Q Q R S N  |                                             |
| 17E5 VK            | - - - - -                                   |
| - - - - -          |                                             |
| L6 línea germinal  | W P                                         |
| JK5 línea germinal | I T F G Q G T R L E I K                     |
| 17E5 VK            | - - - - -                                   |

FIGURA 18

1

50  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (1)  
MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAQEGAPQLPCSPTIPL  
Clon pa23-5 de ADNc (1)  
MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAQEGAPQLPCSPTIPL  
51

100  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (51)  
QDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT  
Clon pa23-5 de ADNc (51)  
QDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT

**péptido bucle extra**

101

150  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (101)  
VLSVGPGGRLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT  
Clon pa23-5 de ADNc (101)  
VLSVGPGGRLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT  
151

200  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (151)  
VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASV  
Clon pa23-5 de ADNc (151)  
VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASV  
201

250  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (201)  
HWFRSRGQGRVPVQGSPPHHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFN  
Clon pa23-5 de ADNc (201)  
HWFRSRGQGRVPVQGSPPHHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFN  
251

300  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (251)  
VSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAP  
Clon pa23-5 de ADNc (251)  
VSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAP  
301

350  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (301)  
PGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSAQAGTYICHIRLQGQQLNATVTLAI  
Clon pa23-5 de ADNc (301)  
PGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSAQAGTYICHIRLQGQQLNATVTLAI  
351

400  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (351)  
ITVTPKSFSGPSGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA  
Clon pa23-5 de ADNc (351)  
ITVTPKSFSGPSGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA  
401

FIGURA 19

450  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (401)  
QEAQLLSQPWQCQLHQGETLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL  
Clon pa23-5 de ADNc (401)  
QEAQLLSQPWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL  
451

500  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (451)  
PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE  
Clon pa23-5 de ADNc (451)  
PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE  
Dominio Transmembrana  
501

534  
LAG-3 de rhesus (XM\_001108923) (501)  
ELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL-  
Clon pa23-5 de ADNc (501)  
ELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL-

FIGURA 19 Cont.

MO0221PCT sequence listing in txt.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Thudium, Kent B.  
Selby, Mark  
Korman, Alan J.  
LeBlanc, Heidi N.  
Zens, Kyra D.  
Yamanaka, Mark

<120> Human Antibodies That Bind Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3),  
And Uses Thereof

<130> 0221PC1

<140> WO 00/000000

<141> 2009-08-11

<150> US 61/188548

<151> 2008-08-11

<160> 94

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Tyr Tyr Trp Asn  
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Tyr Gly Met Ser  
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Tyr Tyr Trp Ser  
1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

## M00221PCT sequence listing in txt.txt

Glu Val Ser Met His  
1 5

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

<400> 6

Ser Tyr Gly Met His  
1 5

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

<400> 7

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

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

<400> 8

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

Gly

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

<400> 9

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

Gly

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

<400> 10

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

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

<400> 11

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
Page 2

## M00221PCT sequence listing in txt.txt

1

5

10

15

Gly

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

&lt;400&gt; 12

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

Gly

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

&lt;400&gt; 13

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

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

&lt;400&gt; 14

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

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

&lt;400&gt; 15

Pro Val Gly Val Val  
 1 5

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

&lt;400&gt; 16

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

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

&lt;400&gt; 17

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

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

<400> 18

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

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

<400> 19

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

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

<400> 20

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

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

<400> 21

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

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

<400> 22

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

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

<400> 23

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

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

<400> 24

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

<400> 25

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

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

<400> 26

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5

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

<400> 27

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
 1 5

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

<400> 28

Asn Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

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

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

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

<400> 30

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

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



## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

&lt;400&gt; 31

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 32

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr  
1 5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr  
1 5

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 37

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 38  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

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

<400> 39

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

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

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

Thr Thr Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 40  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 40

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ala Leu  
65 70 75 80

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

Arg Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Glu Asp Ser Trp Gly Pro  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 41  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 41

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu  
Page 8

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

20

25

30

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

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

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

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

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

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

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

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 43

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

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

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

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

<210> 44  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

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

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

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

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

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 47

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

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

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

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

<210> 48  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 49

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc  | 60  |
| acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc | 120 |
| ccaggaagg ggctggagt gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac   | 180 |
| ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg | 240 |
| aagctgaggt ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt  | 300 |
| gactacgagt acaactgggt cgaccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca  | 360 |

<210> 50  
<211> 366  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

<400> 50  
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaatgg 300  
 gcagtggcct cctgggacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacccgc 360  
 tcctca 366

<210> 51  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 51  
 gaggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacatattat 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccggagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtac cactgggggc 300  
 tactggggcc aggggaaccct ggtcacccgc tcctca 336

<210> 52  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 52  
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc catcggaac cctgtccctc 60  
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120  
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caactgcaac 180  
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ggagatacgt ccaagaaaca gttcgccctg 240  
 aagctgaact ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtctatt actgtgagag aggatacagat 300  
 attttgactg gttattatga ggactcctgg ggcccgggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 53  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 53  
 acccacgacc aggtccagct ggtacagtct ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca 60  
 gtgaaggctc cctgcaaggc ttccggatac accctcactg aagtatccat gcactgggtg 120  
 cgacaggctc ctggaaaagg gcttgagtggt atgggaggtt ttgacctga agatggtgaa 180  
 acaatctacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacatga ccgaggacac atctacagac 240  
 acagcctaca tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgca 300  
 acagcctttg tagtggtggt agctgcttct gactactggg gccaggggaa cctgggtcacc 360  
 gtctcctca 369



## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

<210> 54  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 54  
 caggtgcacc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccc 300  
 cattgtagta gtaccaactg ctaccttttt gactactggg gccaggggaa cctgggtcacc 360  
 gtctcctca 369

<210> 55  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 55  
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtc gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac ttttggccag 300  
 gggaccaacc tggagatcaa a 321

<210> 56  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttctctc tcaccatcag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gctcaccatt cactttcggc 300  
 cctgggacca aagtggatat caaa 324

<210> 57  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 57  
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagg agtgcttttag cctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag ttttaatagtt acccgtagac ttttggccag 300

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

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

<210> 59  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 59  
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgtggac gttcggccaa 300  
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 60  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 60  
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctatcac cttcggccaa 300  
gggacacgac tggagattaa a 321

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (98)..(98)  
<223> Residue 98 is presented only in a subset of figures.

<400> 61  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

Arg Gly

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(3)  
<223> Residues 1-3 are presented only in a subset of figures.

<400> 62

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

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

<400> 63

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

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

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

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

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

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

<210> 64

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Residue 1 is presented only in a subset of figures.

<400> 64

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

<210> 65  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 66  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 66

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

<210> 67  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 67

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

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

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

<210> 68  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 68

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

<210> 69  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Residues 1-2 are only presented in a subset of figures.

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

<400> 70

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

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

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

<400> 72

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

<210> 73  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

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

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

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr  
100

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

<400> 74

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

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

<400> 75

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

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

<400> 76

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly  
1 5

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

<400> 77

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp  
1 5

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

<400> 78

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly  
1 5

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

<400> 79

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

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr  
Page 20

MO0221PCT sequence listing in txt.txt

20

25

30

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

<400> 80

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

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

<400> 81

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

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

<400> 82

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

<210> 83  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 83

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

<210> 84  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 84

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

<210> 85  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 85

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

<210> 86  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 86



## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

<210> 87  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 87

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

<210> 88  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 88

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

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

<400> 89

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

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

<400> 90

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

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

<210> 91  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> 5Mcyn1408 primer

<400> 91  
atgtgggagg ctccgttcct g

21

<210> 92  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> 3Mcyn1408a primer

<400> 92  
gtcagagctg ctccggctc

19

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## MO0221PCT sequence listing in txt.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Gln Leu  
530

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

## MO0221PCT 'sequence listing in txt.txt

&lt;400&gt; 94

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly  
 Page 25

MO0221PCT sequence listing in txt.txt  
295 300

290

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Glu Gln Leu  
530

## LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Thudium, Kent B.  
Selby, Mark  
Korman, Alan J.  
LeBlanc, Heidi N.  
Zens, Kyra D.  
Yamanaka, Mark

10 <120> Anticuerpos humanos que se unen al gen 3 de activación linfocitaria  
(LAG-3), y los usos de estos

<130> 0221PC1

15 <140> WO 00/0000000  
<141> 2009-08-11

<150> US 61/188548  
<151> 2008-08-11

20 <160> 94  
<170> PatentIn versión 3.4

25 <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 1  
Asp Tyr Tyr Trp Asn  
1 5

35 <210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <400> 2  
Ser Tyr Gly Met His  
1 5

45 <210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <400> 3  
Asp Tyr Gly Met Ser  
1 5

55

## 2

5      <210> 4  
       <211> 5  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 4  
 10     Gly Tyr Tyr Trp Ser  
       1                      5  
       <210> 5  
       <211> 5  
       <212> PRT  
 15     <213> Homo sapiens  
       <400> 5  
 20     Glu Val Ser Met His  
       1                      5  
       <210> 6  
       <211> 5  
 25     <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 6  
 30     Ser Tyr Gly Met His  
       1                      5  
       <210> 7  
       <211> 16  
 35     <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 7  
 40     Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
       1                      5                      10                      15  
       <210> 8  
       <211> 17  
 45     <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 8  
 50     Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
       1                      5                      10                      15  
 55     Gly

5 <210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 10 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 15  
 20 <210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 25 Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Cys Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 30 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 35 Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
 40 Gly  
 45 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 50 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 55 Gly



## 4

5 <210> 13  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro  
 1 5 10  
 10  
 15 <210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14  
 20 Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 25 <210> 15  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15  
 30 Pro Val Gly Val Val  
 1 5  
 35 <210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 40 Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Glu Asp Ser  
 1 5 10  
 45 <210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17  
 50 Ala Phe Val Val Val Val Ala Ala Ser Asp Tyr  
 1 5 10  
 55 <210> 18

5

<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 18  
Asp Pro His Cys Ser Ser Thr Asn Cys Tyr Leu Phe Asp Tyr  
1 5 10  
10 <210> 19  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15 <400> 19  
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
20 <210> 20  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 20  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
30 <210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
35 <400> 21  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Ala Leu Ala  
1 5 10  
40 <210> 22  
<211> 11  
<212> PRT  
45 <213> Homo sapiens  
<400> 22  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
50 <210> 23  
<211> 11  
55 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

10 <210> 24  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

20 <210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

25 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

30 <210> 26  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 26

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

40 <210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 27

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

50 <210> 28  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55

5           <400> 28  
           Asn Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
           1                           5  
 10           <210> 29  
           <211> 7  
           <212> PRT  
           <213> Homo sapiens  
           <400> 29  
 15           Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
           1                           5  
 20           <210> 30  
           <211> 7  
           <212> PRT  
           <213> Homo sapiens  
           <400> 30  
 25           Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
           1                           5  
 30           <210> 31  
           <211> 9  
           <212> PRT  
           <213> Homo sapiens  
           <400> 31  
 35           Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
           1                           5  
 40           <210> 32  
           <211> 9  
           <212> PRT  
           <213> Homo sapiens  
           <400> 32  
 45           Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr  
           1                           5  
 50           <210> 33  
           <211> 9  
           <212> PRT  
           <213> Homo sapiens  
 55           <400> 33

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

5 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 34

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

15 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 35

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr  
 1 5

25 <210> 36  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 36

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr  
 1 5

35 <210> 37  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 37

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

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

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

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

## 9

|    |                                                                 |     |     |     |    |  |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|----|--|
|    | 50                                                              |     | 55  |     | 60 |  |
| 5  | Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu | 65  | 70  | 75  | 80 |  |
| 10 | Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala | 85  | 90  | 95  |    |  |
| 15 | Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln | 100 | 105 | 110 |    |  |
| 20 | Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser                                 | 115 | 120 |     |    |  |
| 25 | <210> 38<br><211> 122<br><212> PRT<br><213> Homo sapiens        |     |     |     |    |  |
| 30 | Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg | 1   | 5   | 10  | 15 |  |
| 35 | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr | 20  | 25  | 30  |    |  |
| 40 | Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | 35  | 40  | 45  |    |  |
| 45 | Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val | 50  | 55  | 60  |    |  |
| 50 | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr | 65  | 70  | 75  | 80 |  |
| 55 | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | 85  | 90  | 95  |    |  |
|    | Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp | 100 | 105 | 110 |    |  |
|    | Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser                         | 115 | 120 |     |    |  |

5 <210> 39  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39  
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 15 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 20 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 30 Thr Thr Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110  
 35 <210> 40  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 40  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 45 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
 50 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 55 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Cys Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ala Leu  
65 70 75 80

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

10 Arg Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Glu Asp Ser Trp Gly Pro  
100 105 110

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

20 <210> 41  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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



<210> 42  
<211> 123  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
  
<400> 42  
  
Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
10  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
15  
  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
20  
  
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
25  
  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
30  
  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
35  
  
Ala Arg Asp Pro His Cys Ser Ser Thr Asn Cys Tyr Leu Phe Asp Tyr  
100 105 110  
40  
  
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
45  
  
<210> 43  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 43  
  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
50  
  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30  
55  
  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

## 13

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

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

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

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

<210> 44  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 46

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

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

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

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

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

15

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

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

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

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

|    |       |              |
|----|-------|--------------|
| 45 | <210> | 48           |
|    | <211> | 107          |
|    | <212> | PRT          |
|    | <213> | Homo sapiens |

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

25 <210> 49  
      <211> 360  
      <212> ADN  
      <213> Homo sapiens

30 <400> 49  
      caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc  
      60

35 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc  
      120

40 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac  
      180

45 ccgtccctca agagtgcagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg  
      240

50 aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt  
      300

55 gactacgagt acaactgggt cgaccctgg gccagggaa ccttggtcac cgtctcctca  
      360

60 <210> 50  
      <211> 366  
      <212> ADN  
      <213> Homo sapiens

65 <400> 50  
      caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc  
      60

70 tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct  
      120

17

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat  
180

5 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  
240

ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaatgg  
300

10 gcagtggcct cctgggacta cggtatggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc  
360

tcttca  
366

15

<210> 51  
<211> 336  
<212> ADN  
20 <213> Homo sapiens

<400> 51  
gaggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc  
60

25 tcttgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct  
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacatattat  
180

30 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccggagaca acgccaagaa ctccctgtat  
240

35 ctgcaaataga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtac cactgggggc  
300

tactggggcc aggggaacct ggtcaccgtc tcttca  
336

40

<210> 52  
<211> 360  
<212> ADN  
45 <213> Homo sapiens

<400> 52  
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc catcggaac cctgtccctc  
60

50 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc  
120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caactgcaac  
180

55

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ggagatacgt ccaagaaaca gttcgccctg  
 240

5 aagctgaact ctgtgaccgc cgcggaacacg gctgtctatt actgtgcgag aggatacga  
 300

attttgactg gttattatga ggactcctgg ggcccgggaa ccctggtcac cgtctcctca  
 360

10

<210> 53  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 53  
 acccacgacc aggtccagct ggtacagtct ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca  
 60

20 gtgaaggtct cctgcaaggt ttccggatac accctcactg aagtatccat gcactgggtg  
 120

cgacaggctc ctggaaaagg gcttgagtgg atgggaggtt ttgatcctga agatggtgaa  
 180

25 acaatctacg cacagaagtt ccagggcaga gtcaccatga ccgaggacac atctacagac  
 240

30 acagcctaca tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgca  
 300

acagcctttg tagtgggtgt agctgcttct gactactggg gccagggaa cctggtcacc  
 360

35 gtctcctca  
 369

40

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

<400> 54

45 caggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc  
 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct  
 120

50 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat  
 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  
 240

55

ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccc  
300

5 cattgtagta gtaccaactg ctaccttttt gactactggg gccaggggaa cctgggtcacc  
360

gtctcctca  
369

10 <210> 55  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

15 <400> 55  
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc  
60

20 ctctcctgca gggccagtc gagtattagc agctaactag cctgggtacca acagaaacct  
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc  
180

25 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct  
240

30 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctctcac ttttggccag  
300

gggaccaacc tggagatcaa a  
321

35 <210> 56  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

40 <400> 56  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc  
60

45 ctctcctgca gggccagtc gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa  
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca  
180

50 gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag  
240

cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gtcaccatt cactttcggc  
300

55



cctgggacca aagtggatat caaa  
324

- 5 <210> 57  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens
- 10 <400> 57  
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc  
60
- 15 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagg agtgctttag cctgggtatca gcagaaacca  
120
- 20 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca  
180
- 20 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct  
240
- gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtagac ttttggccag  
300
- 25 gggaccaagc tggagatcaa a  
321
- 30 <210> 58  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens
- 35 <400> 58  
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc  
60
- ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc agctacttag cctgggtacca acagaaacct  
120
- 40 ggccaggctc ccaggctcct catctataat gcaccaaca gggccactgg catcccagcc  
180
- 45 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct  
240
- 45 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga  
300
- 50 gggaccaagg tggagatcaa a  
321
- 55 <210> 59  
<211> 321  
<212> ADN

```

<213> Homo sapiens

<400> 59
5 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
120

10 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactotca ccatcagcag cctagagcct
240

15 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgtggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggaaatcaa a
20 321

<210> 60
<211> 321
25 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

30 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc
35 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactotca ccatcagcag cctagagcct
240

40 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccatcac cttcggccaa
300

gggacacgac tggagattaa a
321

45 <210> 61
<211> 98
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
55 <223> El residuo 98 se presenta únicamente en un subgrupo de figuras.

```

22

<400> 61

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

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

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

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

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

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

25 Arg Gly

30 <210> 62  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(3)  
40 <223> Los residuos 1-3 se presentan únicamente en un subgrupo de  
figuras.  
<400> 62

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

<210> 63  
<211> 95  
<212> PRT  
50 <213> Homo sapiens  
<400> 63

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

## 23

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

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

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

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

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

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

30    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (1)..(1)  
       <223> El residuo 1 se presenta únicamente en un subgrupo de figuras.  
       <400> 64

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

40    <210> 65  
       <211> 98  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 65

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

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

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

## 24

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

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

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

Ala Arg

15

<210> 66  
<211> 16  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 66

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

<210> 67  
<211> 96  
30 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 67

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

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

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

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

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

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

25

5 <210> 68  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 68  
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
 1 5 10  
 10  
 15 <210> 69  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 69  
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 30 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg  
 50 <210> 70  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)

## 26

<223> Los residuos 1-2 se presentan únicamente en un subgrupo de figuras.

<400> 70

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

10 <210> 71  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71

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

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

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

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

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

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

40 <210> 72  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

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

50 <210> 73  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 73

27

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

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

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

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

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

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

25 Tyr Tyr Cys Ala Thr  
 100

30 <210> 74  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 74

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

40 <210> 75  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 75

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

50 <210> 76  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 76



Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly  
1 5

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

10 <400> 77

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp  
1 5

15 <210> 78  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 78

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly  
1 5

25 <210> 79  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 79

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

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

40 <210> 80  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 80

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

50 <210> 81  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55

## 29

<400> 81  
 Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly  
 1 5 10  
 5  
 <210> 82  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 82  
 Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His  
 1 5 10  
 15  
 <210> 83  
 <211> 12  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 83  
 25 Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala  
 1 5 10  
 30 <210> 84  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 84  
 35 His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro  
 1 5 10  
 40 <210> 85  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 85  
 45 Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser  
 1 5 10  
 50 <210> 86  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 86

## 30

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

5  
<210> 87  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 87

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

15  
<210> 88  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 88

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

25  
<210> 89  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 89

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

35  
<210> 90  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Macaca sp.

<400> 90

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

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

50  
<210> 91  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Artificial

31

<220>  
 <223> cebador 5Mcyn1408  
  
 <400> 91  
 5 atgtgggagg ctcagttcct g  
 21  
  
 <210> 92  
 10 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 15 <223> cebador 3Mcyn1408a  
  
 <400> 92  
 gtcagagctg ctccggctc  
 19  
  
 20 <210> 93  
 <211> 532  
 <212> PRT  
 <213> Macaca mulatta  
 25 <400> 93  
  
 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp  
 1 5 10 15  
 30 Val Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val  
 20 25 30  
 35 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile  
 35 40 45  
 40 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln  
 50 55 60  
 45 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Gly His Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro  
 85 90 95  
 50 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly  
 100 105 110  
 55 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln

## 32

|    | 115                                                                                | 120 | 125 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala<br>130 135 140     |     |     |
| 10 | Gly Glu Tyr Arg Ala Thr Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys<br>145 150 155 160 |     |     |
|    | Arg Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro<br>165 170 175     |     |     |
| 15 | Gly Ser Leu Arg Thr Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser<br>180 185 190     |     |     |
| 20 | Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln<br>195 200 205     |     |     |
| 25 | Gly Arg Val Pro Val Gln Gly Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser<br>210 215 220     |     |     |
|    | Phe Leu Phe Leu Pro His Val Gly Pro Met Asp Ser Gly Leu Trp Gly<br>225 230 235 240 |     |     |
| 30 | Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn<br>245 250 255     |     |     |
| 35 | Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Ala Thr Pro Leu Val Tyr Ala Gly<br>260 265 270     |     |     |
| 40 | Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Ala Val Gly<br>275 280 285     |     |     |
|    | Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly Pro<br>290 295 300     |     |     |
| 45 | Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu<br>305 310 315 320 |     |     |
| 50 | Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg Leu<br>325 330 335     |     |     |
| 55 | Gln Gly Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val<br>340 345 350     |     |     |

## 33

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Pro Glu Gln Leu  
           530

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

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Phe Leu Phe Leu Pro His Val Gly Pro Met Asp Ser Gly Leu Trp Gly

35

|    |                                                                 |     |     |     |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | 225                                                             |     | 230 |     | 235 |     | 240 |
| 5  | Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn | 245 |     | 250 |     | 255 |     |
| 10 | Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Ala Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala | 260 |     | 265 |     | 270 |     |
| 15 | Gly Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Ala Val | 275 |     | 280 |     | 285 |     |
| 20 | Gly Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly | 290 |     | 295 |     | 300 |     |
| 25 | Pro Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu | 305 |     | 310 |     | 315 | 320 |
| 30 | Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg | 325 |     | 330 |     | 335 |     |
| 35 | Leu Gln Gly Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr | 340 |     | 345 |     | 350 |     |
| 40 | Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu | 355 |     | 360 |     | 365 |     |
| 45 | Cys Glu Val Thr Pro Ala Ser Gly Gln Glu His Phe Val Trp Ser Pro | 370 |     | 375 |     | 380 |     |
| 50 | Leu Asn Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala | 385 |     | 390 |     | 395 | 400 |
| 55 | Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln | 405 |     | 410 |     | 415 |     |
|    | Gly Glu Thr Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser | 420 |     | 425 |     | 430 |     |
|    | Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Arg Ala Gly | 435 |     | 440 |     | 445 |     |
|    | His Leu Pro Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Phe Leu Leu Leu Leu | 450 |     | 455 |     | 460 |     |



36

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

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

[illegible]

Glu Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro  
15                515                      520                      525

Glu Pro Glu Gln Leu  
530

20

25

30

35

40

45

50

55

|                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><br><b>No. 11-012595- -00000-0000</b><br>Fecha: 2011-02-03 16:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR<br>Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI<br>Act. 411 PRESENTACION Folios: 437 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UT

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                     |                                                                                                                         |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input type="checkbox"/>            | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input type="checkbox"/>   | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |



Bogotá D.C.,  
2020

Doctor(a)  
CORREA ORDOÑEZ ALVARO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
MEDAREX, INC

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 11 012595         |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2009/053405 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 11/03/2011        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 |                   |

**06099**

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a los dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.
2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 11 012595

  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

442

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ  
Director de Nuevas Creaciones (c)

08 ABR. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha \_\_\_\_\_.  
adpa11