

PA 7663814

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS AQUELLOS A LOS QUE IRÁ DIRIGIDA LA
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

16 de enero de 2018

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE LA ANEXA A LA
PRESENTE ES UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA
OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
DE AQUELLOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE
IDENTIFICADA MAS ADELANTE QUE CUMPLIERON CON LOS
REQUISITOS PARA QUE LES SEA CONCEDIDA UNA FECHA DE
REGISTRO DE ACUERDO AL 35 USC 111.

NUMERO DE SOLICITUD: 62/172,277

FECHA DE PRESENTACION: 08 de junio de 2015

EL CÓDIGO DEL PAÍS Y EL NÚMERO DE SU SOLICITUD DE
PRIORIDAD, QUE SE UTILIZARÁ PARA PRESENTAR EN EL
EXTRANJERO BAJO EL CONVENIO DE PARÍS, ES
US62/172,277

Por Autorización del
Subsecretario de Comercio para la
Propiedad Intelectual y Director de la
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos



Firma

P. R. Grant

Funcionario Certificador

Acuse de Recibo Electrónico	
EFS ID:	22558560
Número de Solicitud:	62172277
Número de Solicitud Internacional:	
Número de Confirmación:	1005
Título de la Invención:	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS
Primer Inventor Mencionado/Nombre del Solicitante:	Leslie S. Johnson
Número de Cliente:	66522
Tributante:	Lisa Karen Kreppel
Declarante Autorizado por:	
Número de Caso del Abogado:	1301.0121P
Fecha de Recepción:	08-JUN-2015
Fecha de Presentación:	
Sello de Hora:	09:18:10
Tipo de Solicitud:	Provisional
Información de Pago	
Presentado con el Pago	sí
Tipo de Pago	Tarjeta de Crédito
El pago fue recibido exitosamente en RAM	\$130
Número de Confirmación RAM	8907
Cuenta de Depósito	
Usuario Autorizado	
El Director de la USPTO por este medio está	

III

autorizado a cobrar los derechos indicados y
acreditar cualquier pago excedente como sigue:

Lista de Archivos:					
Número de Documento	Descripción del Documento	Nombre del Archivo	Tamaño del Archivo (Bytes) / Resumen de Mensaje	Múltiples Partes/.zip	Páginas (si es sol.)
1		1301.01 21P_Specification.pdf	590256	no	112
			092cb2b 19ced8a 9a0ee1f 37805fb ee4a256 016de		

	Descripción de Múltiples Partes/Archivos PDF en descripción .zip				
	Descripción del Documento	Inicio	Final		
	Especificación	1	105		
	Reivindicaciones	106	111		
	Resumen	112	112		
Advertencias:					
Información:					
2	Dibujos-Distintos Dibujos en blanco y negro	1301_012 1P_Specification.pdf	3320626	no	19
			af3442e c083e5a 6685ace e757a84 a0cf9f2 b1242		

Advertencias:					
Información:					
3	Hoja de Datos de Solicitud	aia0014.pdf	1894809	no	8
			c213d34cb55e6aee71a74ff15c4b987688fab8b2		
Advertencias:					
Información:					
4	Hoja de Portada Provisional	sb0016.pdf	303542	no	3
			f8c34caf0f7fe9687b54f090f87ae1010e836efe		
Advertencias:					
Información:					
5	Hoja de Datos de Solicitud	Fee-info.pdf	29348	no	2
			e480a5c97e73de7530f4a6d77a88dc2e97c5e65c		
Advertencias:					
Información:					
Tamaño Total de Archivos (en bytes):				6138581	

Copia proporcionada por la USPTO de la Base de Datos de Imagen de IFW el 06/07/2016

Este Acuse de Recibo evidencia el recibo en la

fecha anotada por la USPTO de los documentos indicados, caracterizados por el solicitante, e incluyen el conteo de páginas, según sea el caso. Esto sirve como evidencia del recibo similar a una Tarjeta Postal, como se describió en MPEP 503.

Nuevas Solicitudes Bajo el 35 U.S.C. 111

En caso de que se esté presentando una nueva solicitud y la solicitud incluya los componentes necesarios para una fecha de presentación (ver 37 CFR 1.53 (b)-(d) y MPEP 506), se expedirá un Recibo de Presentación (37 CFR 1.54) a su debido tiempo y la fecha mostrada en este Acuse de Recibo establecerá la fecha de presentación de la solicitud.

Etapas Nacional de una Solicitud Internacional Bajo el 35 U.S.C. 371

En caso de que se cumpla el tiempo de inscripción de ingreso para que una solicitud internacional entre a la etapa nacional de acuerdo con las condiciones del 35 U.S.C. 371 y otros requerimientos aplicables se emitirá

un formato PCT/DO/EO/903 indicando la aceptación de la solicitud como una inscripción de la etapa nacional bajo el 35 U.S.C. 371 será expedido además del Recibo de Presentación, a su debido tiempo.

Nueva Solicitud Internacional Presentada en la USPTO como una Oficina Receptora

En caso de que se esté presentando una nueva solicitud internacional y la solicitud internacional incluye los componentes necesarios para una fecha de presentación internacional (ver Artículo 11 del PCT y 1810 de MPEP), se expedirá una Notificación del Número de la Solicitud Internacional y de la Fecha de Presentación Internacional (Formato PCT/RO/105) a su debido tiempo, sujeta a las prescripciones concernientes a la seguridad nacional, y la fecha mostrada en este Acuse de Recibo establecerá la fecha de presentación internacional de la solicitud.

PTO/SB/16 (03-13)
 Aprobada para ser
 empleada hasta el
 31/01/2014. OMB
 0651-0032 Oficina
 de Patentes y Marcas
 de los E.U.A.;
 DEPARTAMENTO DE
 COMERCIO de los E.U.A.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995,
 ninguna persona está obligada a responder a una
 solicitud de información a menos que muestre un
 número de control valido de la OMB.

SOLICITUD PROVISIONAL PARA PORTADA DE PATENTE -
Página 1 de 2

La presente es una petición para presentar una
 SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTE de acuerdo al
 37 CFR 1.53(c).

No. de Etiqueta de Correo
Expreso _____

INVENTOR (ES)		
Nombre (primero y segundo [si lo hay])	Nombre Familiar o Apellido	Residencia (Ciudad y ya sea Estado o País Extranjero)
Leslie S.	Johnson	Darnestown, MD
Paul A.	Moore	Bethesda, MD
Doug	Smith	San Mateo, CA
Ross	La Motte-Mohs	Gaithersburg, MD
Kalpana	Shah	Boyd's, MD
Inventores adicionales serán nombrados en las hojas numeradas por separado == anexadas a la presente.		
TÍTULO DE LA INVENCION (máximo 500 caracteres):		
MOLECULAS DE UNION A LAG-3 Y METODOS DE USO DE		

LAS MISMAS		
DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA		
Dirigir toda la Correspondencia a: [x] La dirección correspondiente al Número de Cliente: 66522 O		
[] Firma o Nombre Individual		
Dirección		
Ciudad	Estado	Código Postal
País	Teléfono	Email
PARTES DE LA SOLICITUD ANEXAS (marque todo lo que sea aplicable)		
[x] Hoja de Datos de la Solicitud [x] Dibujo(s) Número de Hojas <u>19</u> [x] Especificación (v.gr. (vgr., descripción de la invención) Número de Páginas <u>140</u> [] CD(s), Número de de CDs <u>-----</u> [] Otro (especificar) <u> </u>		
Derechos Pagaderos: Derecho de Presentación de \$260 (\$130 para pequeña entidad) (\$65 para microentidad). Si la especificación y dibujos exceden de 100 hojas de papel, un derecho por tamaño de la solicitud también es pagadero, que es de \$400 (\$200 para pequeña entidad) (\$100 para micro entidad) para cada una de las 50 hojas adicionales o fracción de las mismas. Ver 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) y 37 CFR 1.16(s).		

**METODO DE PAGO DEL DERECHO DE PRESENTACION Y
DERECHO POR TAMAÑO DE LA SOLICITUD PARA ESTA
SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTE**

- ☐ El solicitante afirma estado de pequeña entidad. Ver 37 CF 1.27.
- ☐ El solicitante certifica estado de micro entidad. [\$330.00]
Ver 37 CFR 1.29. CANTIDAD TOTAL
DEL DERECHO(\$)
El solicitante debe adjuntar formato
PTO/SB/15A o B o equivalente.
- ☐ Un cheque o giro postal hecho pagadero para el
Director de la Oficina de Patentes y Marcas
de los Estados Unidos se adjunta para cubrir
el derecho de presentación y el derecho por
tamaño de la solicitud (si es aplicable)
- ☒ Pago con Tarjeta de crédito.
- ☒ El Director por este medio está autorizado a
cargar cualquier deficiencia o acreditar
cualquier pago excedente a la Cuenta de
Depósito Número: 50-5419 del Representante
del
Solicitante

**USE SOLO PARA PRESENTAR UNA SOLICITUD PROVISIONAL
PARA PATENTE**

Esta recolección de información es requerida por el 37 CFR 1.51. La información es requerida para obtener o retener un beneficio por el público que es para presentar (y por la USPTO para procesar) una solicitud. Confidencialmente es regida por el

35 U.S.C. 122 y por el 37 CFR 1.11 y 1.14. Esta recolección se estima que toma 10 horas para llenarse, incluyendo la reunión, preparación, y presentación del formato de la solicitud completado a la USPTO. El tiempo variará dependiendo del caso individual. Cualesquiera comentarios sobre la cantidad de tiempo que usted requiera para llenar este formato y/o sugerencias para reducir esta carga, deben ser enviados al Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. NO ENVIE DERECHOS O FORMATOS COMPLETADOS A ESTA DIRECCION. **ENVIE A: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450**

Si usted necesita ayuda para completar el formato, llame al 1-800-PTO-9199 y seleccione la opción 2.

PTO/SB/16 (03-13)

Aprobada para ser empleada hasta el 31/01/2014.
OMB 0651-0032 Oficina de Patentes y Marcas de los
E.U.A.; DEPARTAMENTO DE COMERCIO de los E.U.A.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995,
ninguna persona está obligada a responder a una
solicitud de información a menos que muestre un
número de control valido de la OMB.

SOLICITUD PROVISIONAL PARA PORTADA DE PATENTE

Página 2 de 2

La invención fue realizada por una agencia del
Gobierno de los Estados Unidos o bajo un
contrato con una agencia del Gobierno de los
Estados Unidos

☒ No

☐ Si, la invención fue hecha por una agencia
del Gobierno de los E.U.A. El nombre de la
agencia del Gobierno de los E.U.A. es:

☐ Si, la invención fue hecha bajo un contrato
con una agencia del Gobierno de los E.U.A. El
nombre de la agencia del Gobierno de los E.U.A.
y el número de contrato con el Gobierno
son: _____

ADVERTENCIA

XIII

El peticionario/solicitante es advertido que evite presentar información personal en los documentos presentados en una solicitud de patente que puede contribuir a robo de identidad. La información personal tales como los números de seguridad social, números de cuenta de banco o números de tarjeta de crédito (distintos a un cheque o formato de autorización de tarjeta de crédito del PTO-2038 presentado con propósitos de pago) nunca es requerido por la USPTO para apoyar una petición o una solicitud. Si este tipo de información personal es incluida en documentos presentados a la USPTO, los peticionarios/solicitantes deben considerar redactar dicha información personal de los documentos antes de presentarlos a la USPTO. El peticionario/solicitante es asesorado para que el registro de una solicitud de patente esté disponible al público después de la publicación de la solicitud (a menos que una solicitud de no publicación de acuerdo con el 37 CFR 1.213(a) sea hecha en la solicitud) o la emisión de una patente. Además, el registro de una solicitud abandonada también puede estar disponible al público si la solicitud es referenciada en una

XIV

solicitud publicada o una patente emitida (ver 37 CFR 1.14). Los cheques y formatos de autorización de tarjeta de crédito PTO-2038 presentados con propósitos de pago no son retenidos en el expediente de la solicitud y por lo tanto no están disponibles para publicidad.

FIRMA /Lisa Kreppel Fecha 8 de Junio de 2015

NOMBRE MECANOGRAFIADO o LETRA DE MOLDE: Lisa Kreppel

NO. DE REGISTRO 56970 (si es apropiado)

TELEFONO: 301-963-0717 Caso Número: 1301.0121P

Declaración de la Ley de Privacidad

La Ley de Privacidad de 1974 (P.L. 93-579) requiere que le sea dada cierta información con relación a su presentación del formato anexo relacionado con una solicitud de patente o patente. Por consiguiente, de acuerdo con los requerimientos de la Ley, por favor tenga en cuenta que: (1) la autoridad general para la recopilación de esta información es el 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) el suministro de la información solicitada es voluntaria; y (3) el propósito principal para el cual la información es utilizada por la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU es para procesar y/o examinar su presentación relacionada con una solicitud de patente o patente. Si usted no suministra la información requerida, la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU no puede ser capaz de procesar y/o examinar su presentación, lo cual puede dar como resultado el término de los procedimientos o abandono de la solicitud o expiración de la patente.

La información proporcionada por usted en este formato será sometida a los siguientes usos de rutina:

1. La información en este formato será tratada confidencialmente en la medida permitida de acuerdo a la Ley de Libertad de Información (5 U.S.C. 552) y la Ley de Privacidad (5 U.S.C. 552a). Los registros de este sistema de registros pueden ser revelados al Departamento de Justicia para determinar si la Ley de Libertad de Información requiere la revelación de estos registros.
2. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, en el curso de la presentación de evidencia a una corte, magistrado, o tribunal administrativo, incluida la publicación a los abogados en el curso de negociaciones de los estatutos.
3. Un registro en este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a un Miembro del Congreso presentando

una solicitud que involucra a una persona, a quien pertenece el registro, cuando el individuo ha solicitado ayuda del Miembro con respecto al tema objeto del registro.

4. Un registro en este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a un contratista de la Agencia que tiene necesidad de la información a fin de realizar un contrato. Los receptores de información deben ser requeridos para cumplir con los requerimientos de la Ley de Privacidad de 1974, en su versión modificada de acuerdo al 5 U.S.C. 552a(m).
5. Un registro relacionado con una Solicitud Internacional presentada de acuerdo con el Tratado de Cooperación en Patentes en este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a la Oficina Internacional de la Organización de la Propiedad Intelectual Mundial, de acuerdo al Tratado de Cooperación en Patentes.
6. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a otra agencia federal para propósitos de revisión de Seguridad Nacional (35 U.S.C. 181) y para revisión de acuerdo a la Ley de Energía Atómica (42, U.S.C. 218(c)).
7. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, al Administrador, Servicios Generales, o su inventor, durante una inspección de registros conducido por GSA como parte de la responsabilidad de la agencia para recomendar mejoras en prácticas y mejoras de manejo de registros, de acuerdo con la autoridad del 44 U.S.C. 2904 y 2906. Dicha revelación debe hacerse de acuerdo con la inspección de gobernación de reglamentos de GSA para este propósito, y cualquier otra directiva relevante (esto es GSA o Comercio). Dicha revelación no debe ser usada para hacer determinaciones acerca de las personas.
8. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, al público después de ya sea la publicación de la solicitud de acuerdo al 35 U.S.C. 122(b) o la emisión de una patente de acuerdo al 35 U.S.C. 151. Además,

un registro puede ser revelado, sujeto a las limitaciones del 37 CFR 1.14, como un uso de rutina, para el público si el registro fue presentado en una solicitud que es abandonada, o en la cual los procedimientos fueron terminados y que la solicitud es referenciada por ya sea una solicitud publicada, una solicitud abierta a inspección pública o una patente emitida.

9. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a una agencia autorizada por la ley local, Federal o Estatal, si la USPTO está consciente de una violación o violación potencial de la ley o reglamento.
-

MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS**Referencia a la Lista de Secuencias:**

[0001] Esta solicitud incluye una o más Listas de Secuencia
5 de conformidad con 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, las cuales
se describen tanto en papel como en medio legible por
computadora, y las cuales descripciones en papel y legibles
por computadora se incorporan en la presente para referencia
en su totalidad.

10

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención:

[0002] La presente invención se dirige a Moléculas de Unión
a LAG-3 que comprenden el dominio de unión de LAG-3 de
15 anticuerpos anti-LAG-3 seleccionados: mAb 1 de LAG-3, mAb 2
de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o
mAb 6 de LAG-3 que son capaces de unirse tanto a LAG-3 de
mono cynomolgus como a LAG-3 humano. La invención se refiere
de forma particular a moléculas de unión a LAG-3 que son
20 versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o
que comprende fragmentos de unión a LAG-3 de tales
anticuerpos anti-LAG-3 (especialmente inmunoconjugados,
diacuerpos, los BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.). La

invención se refiere de forma particular a tales moléculas de unión a LAG-3 que son adicionalmente capaces de unir un epítipo de una molécula que se involucra en la regulación de un punto de control inmune que se encuentra presente en la superficie de una célula inmune. La presente invención también pertenece a métodos para utilizar tales moléculas de unión a LAG-3 para detectar LAG-3 o para estimular una respuesta inmune. La presente invención también pertenece a métodos de terapia de combinación en los cuales una molécula de unión a LAG-3, que comprende uno o más dominios de unión a LAG-3 de los anticuerpos anti-LAG-3 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son efectivas en la estimulación de una respuesta inmune para que de esta forma, se mejore, estimule o sobrerregule adicionalmente tal respuesta inmune en un sujeto.

Antecedentes de la Invención:

I. Respuestas Inmunes Mediadas por Células

[0003] El sistema inmunológico de humanos y otros mamíferos es responsable de proporcionar protección contra infección y enfermedad. Tal protección se proporciona tanto por respuesta inmune humoral como por respuesta inmune mediada por células. La respuesta humoral resulta en la producción de anticuerpos

y otras biomoléculas que son capaces de reconocer y neutralizar objetivos extraños (antígenos). En contraste, la respuesta inmune mediada por células involucra la activación de macrófagos. Las células Exterminadoras Naturales (NK) y los linfocitos-T citotóxicos de antígeno específicos por células T, y la liberación de varias citocinas en respuesta al reconocimiento de un antígeno (Dong, C. et al. (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48).

10 **[0004]** La habilidad de las células T para mediar de forma óptima una respuesta inmune contra un antígeno requiere dos interacciones de señalización distintas (Viglietta, V. et al. (2007) "*Modulating Co-Stimulation*", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "*Checkpoint Blockade in*
15 *Cancer Immunotherapy*", Adv. Immunol. 90:297-339). En primer lugar, el antígeno que se ha colocado en la superficie de las Células que Presentan Antígeno (APC) deben presentarse en una célula CD4⁺ sin tratamiento previo de anideno específico. Tal presentación entrega una señal mediante el Receptor de célula
20 T (**TCR**) que ordena a la Célula T iniciar una respuesta inmune que será específica para el antígeno presentado. En segundo lugar, una serie de señales co-estimuladoras e inhibitorias, mediadas a través de interacciones entre las APC y moléculas

de superficie de células T distintas, desencadenan primero la activación y proliferación de las células T y finalmente su inhibición. De este modo, la primera señal confiere especificidad a la respuesta inmune mientras que la segunda
5 señal sirve para determinar la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta.

[0005] El sistema inmune se encuentra controlado firmemente por ligandos y receptores co-estimuladores y co-inhibidores. Estas moléculas proporcionan la segunda señal para la
10 activación de las células T y proporcionan una red balanceada de señales positivas y negativas para maximizar las respuestas inmunes contra infección mientras limitan la inmunidad para sí mismas (Wang, L. et al. (2011) "*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates*
15 *T-Cell Responses*", J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*", Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). Las vías inhibitorias esenciales para mantener la autotolerancia
20 y modular la duración y amplitud de respuestas inmunes se denominan colectivamente como puntos de control inmunológicos. La unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la Célula que Presenta antígeno y los receptores

CD28 y CTLA-4 del linfocito T CD4⁺ es de particular importancia (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", Immunol. Rev. 229:307-321). La unión del B7.1 o del B7.2 al CD28 estimula la activación de las células T; la unión del B7.1 o B7.2 al CTLA-4 inhibe tal activación (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). El CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse", J. Immunol. 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA-4 se sobre-regula rápidamente después de la activación de células T (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", Immunity 4:535-543). Ya que CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The

B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126), la unión primero inicia la proliferación de células T (mediante CD28) y después la inhibe (mediante la naciente expresión de CTLA-4), por lo que disminuye el efecto cuando ya no se
5 necesita la proliferación.

[0006] Investigaciones adicionales en los ligandos del receptor CD28 han llevado a la identificación y caracterización de un conjunto de moléculas B7 relacionadas (la "Superfamilia B7") (Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "*The B7 Family Revisited*", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*", Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "*Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells*". Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*", Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*", J. Immunother. 30(3):251-
15 260; Agarwal, A. et al. (2008) "*The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance*", Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Wang, S. et al. (2004) "*Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In*
20

Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses", Microbes Infect. 6:759-766). Actualmente existen varios miembros conocidos de la familia: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), el ligando coestimulador inducible (ICOS-L), el ligando de muerte programada 1 (PD-L1; B7-H1), el ligando de muerte programada 2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 y B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", Genome Biol. 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC", Immunogenetics 64(8):571-90).

II. Gen-3 de Activación de Linfocito ("LAG-3")

[0007] El Gen 3 de activación de linfocito codifica una proteína receptora de superficie celular que se conoce como "LAG-3", o CD223 (Triebel, F. et al. (1990) "LAG-3, A Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related To CD4", J. Exp. Med. 171(5):1393-1405). El LAG-3 se expresa por las células T activadas CD4+ y CD8+ y por las células NK, y se expresa constitutivamente por células dendríticas plasmocitoides. El LAG-3 no se expresa por las células B, monocitos o cualquier otro tipo de células probadas (Workman, C.J. et al. (2009)

"LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4):1885-1891).

[0008] Se encontró que el LAG-3 está relacionado estrechamente con el co-receptor CD4 de la célula T (Triebel, F. et al. (1990) "LAG-3, A Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related To CD4", J. Exp. Med. 171(5):1393-1405; Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Huang, C.T. et al. (2004) "Role Of LAG-3 In Regulatory T-Cells", Immunity 21:503-513; Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4):1885-1891). Como el CD4, el LAG-3 también se une a moléculas MHC clase II pero lo hace con una afinidad significativamente mayor (Workman, C.J. et al. (2002) "Phenotypic Analysis Of The Murine CD4-Related Glycoprotein, CD223 (LAG-3)", Eur. J. Immunol. 32:2255-2263; Huard, B. et al. (1995) "CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed With CD4- And Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion Proteins", Eur. J. Immunol. 25:2718-2721; Huard, B. et al. (1994) "Cellular Expression And Tissue Distribution Of The Human LAG-3- Encoded Protein, An MHC Class II Ligand", Immunogenetics 39:213-217).

[0009] Estudios han mostrado que el LAG-3 juega un papel importante en la regulación negativa de proliferación, función y homeostasis de células T (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4):1885-1891; Workman, C.J. et al. (2002) "Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3", J. Immunol. 169:5392-5395; Workman, C.J. et al. (2003) "The CD4-Related Molecule, LAG-3 (CD223), Regulates The Expansion Of Activated T-Cells", Eur. J. Immunol. 33:970-979; Workman, C.J. (2005) "Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)", J. Immunol. 174:688-695; Hannier, S. et al. (1998) "CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling", J. Immunol. 161:4058-4065; Huard, B. et al. (1994) "Lymphocyte-Activation Gene 3/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Modulates The Antigenic Response Of CD4+ T Lymphocytes", Eur. J. Immunol. 24:3216-3221).

[0010] Estudios han sugerido que inhibir la función del LAG-3 a través de bloqueo de anticuerpos puede revertir la inhibición del sistema inmune mediada por LAG-3 y restaurar parcialmente la función efectora (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated

and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. et al. (2007) "LAG-3 Regulates CD8+ T-Cell Accumulation And Effector Function During Self And Tumor Tolerance", J. Clin. Invest. 117:3383-3392). Se ha encontrado que el LAG-3 regula negativamente la expansión de células T mediante la inhibición de flujos de calcio del TCR-inducido, y controla el tamaño del banco de memoria de las células T (Matsuzaki, J. et al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8+ T-Cells Are Negatively Regulated By LAG-3 and PD-1 In Human Ovarian Cancer", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(17):7875-7880; Workman C.J., et al. (2004) "Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates The Size Of The Expanding T-Cell Population Following Antigen Activation in vivo", J. Immunol. 172:5450-5455).

15 **[0011]** Sin embargo, a pesar de todos esos avances previos, permanece una necesidad por composiciones mejoradas capaces de dirigir de forma más vigorosa el sistema inmune del cuerpo para atacar las células cancerosas o células infectadas por patógenos, especialmente a concentraciones terapéuticas más

20 bajas. Pues aunque el adaptable sistema inmune puede ser un poderoso mecanismo de defensa contra el cáncer y trastornos, los mecanismos inmunosupresores en el microentorno del tumor frecuentemente lo obstaculizan, tal como en la expresión del

LAG-3. Además, moléculas co-inhibidoras expresadas por células tumorales, células inmunes y células estromales en el ambiente del tumor pueden de forma dominante atenuar las respuestas de las células T contra células cancerosas. De este modo, permanece una necesidad por moléculas de unión a LAG3 potentes. En particular, existe una necesidad por moléculas de unión a LAG-3 que en un perfil cinético de unión deseable, unan diferentes epítomos LAG-3 y/o exhiban actividad de agente único que podría suministrar valor terapéutico a pacientes que sufren de cáncer u otras enfermedades y padecimientos. La presente invención se dirige a estos y otros objetivos.

Compendio de la Invención:

[0012] La presente invención se dirige a moléculas de unión a LAG-3 que comprenden el dominio de unión a LAG-3 de anticuerpos anti-LAG-3 seleccionados: mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 que son capaces de unirse tanto a LAG-3 de mono cynomolgus como a LAG-3 humano. La invención se refiere de forma particular a moléculas de unión a LAG-3 que son versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o que comprende fragmentos de unión a LAG-3 de tales

anticuerpos anti-LAG-3 (especialmente inmunoconjugados, diacuerpos, los BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.). La invención se refiere de forma particular a tales moléculas de unión a LAG-3 que son adicionalmente capaces de unir un
5 epítipo de una molécula que se involucra en la regulación de un punto de control inmune que se encuentra presente en la superficie de una célula inmune. La presente invención también pertenece a métodos que usan tales moléculas de unión a LAG-3 para detectar LAG-3 o para estimular una respuesta
10 inmunológica. La presente invención también pertenece a métodos de terapia de combinación en los cuales una molécula de unión a LAG-3, que comprende uno o más dominios de unión a LAG-3 de los anticuerpos anti-LAG-3 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales
15 que son efectivas en la estimulación de una respuesta inmune para que de esta forma, se mejore, estimule o sobrerregule adicionalmente tal respuesta inmune en un sujeto.

[0013] En detalle, la invención suministra una molécula de unión a LAG-3 que es capaz de unir tanto a LAG-3 humano como
20 a LAG-3 de mono cynomolgus, en donde comprende los tres Dominios de CDR de Cadena Pesada, CDR_H1, CDR_H2 y CDR_H3, y los tres Dominios de CDR de Cadena Ligera, CDR_L1, CDR_L2, y CDR_L3, en donde:

(A) (1) el Dominio de CDR_H1, el Dominio de CDR_H2, y el Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 1 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:4**, **SEQ ID NO:5**, y **SEQ ID NO:6**; y

5 (2) el Dominio de CDR_L1, el Dominio de CDR_L2, y el Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 1 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:9**, **SEQ ID NO:10**, y **SEQ ID NO:11**;

o

10 (B) (1) el Dominio de CDR_H1, el Dominio de CDR_H2, y el Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 2 de hLAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:14**, **SEQ ID NO:15**, y **SEQ ID NO:16**; y

(2) el Dominio de CDR_L1, el Dominio de CDR_L2, y el
15 Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 2 de hLAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:19**, **SEQ ID NO:20**, y **SEQ ID NO:21**;

o

(C) (1) el Dominio de CDR_H1, el Dominio de CDR_H2, y
20 el Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 3 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:54**, **SEQ ID NO:55**, y **SEQ ID NO:56**; y

(2) el Dominio de CDR_L1, el Dominio de CDR_L2, y el

Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 2 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, y SEQ ID NO:61;**

o

5 (D) (1) el Dominio de CDR_H1, el Dominio de CDR_H2, y el Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 4 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, y SEQ ID NO:66;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, el Dominio de CDR_L2, y el
10 Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 4 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, y SEQ ID NO:71;**

o

(E) (1) el Dominio de CDR_H1, el Dominio de CDR_H2, y
15 el Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 5 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, y SEQ ID NO:76;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, el Dominio de CDR_L2, y el
Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 5 de
20 LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, y SEQ ID NO:81;**

o

(F) (1) el Dominio de CDR_H1, el Dominio de CDR_H2, y

el Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 6 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:85, y SEQ ID NO:86;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, el Dominio de CDR_L2, y el
5 Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 6 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:90, y SEQ ID NO:91.**

[0014] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en donde el
10 Dominio Variable de Cadena Pesada tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:62, o SEQ ID NO:72.**

[0015] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en donde el
15 Dominio Variable de Cadena Ligera tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:67, o SEQ ID NO:77.**

[0016] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en donde el
20 Dominio Variable de Cadena Pesada tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:92, o SEQ ID NO:94.**

[0017] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en donde el

Dominio Variable de Cadena Ligera tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, o SEQ ID NO:102.**

[0018] La invención se refiere además a las modalidades de
5 todas esas moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en donde la molécula es un anticuerpo, y especialmente en donde la molécula es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

[0019] La invención se refiere además a la modalidad en
10 donde la molécula de unión a LAG-3 anti-humano es una molécula de unión biespecífica, capaz de unirse simultáneamente a LAG-3 humano y a un segundo epítipo, y particularmente se refiere a la modalidad en donde el segundo epítipo es un epítipo de una molécula involucrada en la
15 regulación de un punto de control inmune presente en la superficie de una célula inmune (especialmente en donde el segundo epítipo es un epítipo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR,
20 LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA, y de mayor preferencia en donde el segundo epítipo es un epítipo de CD137, OX40, PD-1, TIGIT o TIM-3).

[0020] La invención se refiere además a la modalidad de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde la molécula es un diacuerpo, el diacuerpo es un complejo de unión covalente que comprende dos, o tres, o cuatro moléculas de cadenas de polipéptidos. La invención se refiere además a la modalidad de tales moléculas de unión anti-LAG-3 anti-humano en donde la molécula comprende una Región de Fc. La invención se refiere de forma adicional a la modalidad de tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en la que la molécula comprende un Dominio de Unión de Albúmina, y especialmente un Dominio de Unión de Albúmina desinmunizado.

[0021] La invención se refiere además a las modalidades de todas de tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano en donde la molécula comprende una Región de Fc, y en donde la Región de Fc es una Región de Fc variable que comprende una o más modificaciones de aminoácidos que reduce la afinidad de la Región de Fc variable por un FcγR o estabilizar dicha Región Fc, y más particularmente, en donde las modificaciones comprenden al menos una sustitución seleccionada de un grupo que consiste de L234A; L235A; o L234A y L235A; en donde la numeración es la del índice de la UE de acuerdo con Kabat.

[0022] La invención se refiere además a las modalidades en las que cualquiera de las moléculas de unión a LAG-3

previamente descritas se usa para estimular una respuesta inmune mediada a célula T. La invención se refiere adicionalmente a las modalidades en las que cualquiera de las moléculas de unión a LAG-3 previamente descritas se usa en el
5 tratamiento de un trastorno o padecimiento asociado con un sistema inmune suprimido, especialmente cáncer o una infección.

[0023] La invención particularmente se refiere a tal uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico de cáncer, en donde
10 el cáncer se caracteriza por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste en una célula de: un tumor de glándula adrenal, un cáncer asociado al sida, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer óseo, un cáncer de cerebro y médula
15 espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de seno, unos tumores de cuerpo carotídeo; un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de célula renal cromóforo, un carcinoma de célula clara, un cáncer de colon, un cáncer colorectal, un histiocitoma fibroso benigno
20 cutáneo, un tumor desmoplástico de células redondas pequeñas, uependimoma, un tumor de Erwing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, una fibrogenesis imperfecta ósea, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer de vesícula o de

conducto biliar, cáncer gástrico, un trastorno trofoblástico gestacional, un tumor de célula germinal, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer hepático, un linfoma, un cáncer pulmonar, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplástico, un neuroblastoma, tumores neuroendócrinos, un cáncer ovárico, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar tiroideo, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer prostático, un melanoma uveal posterior, un raro desorden hematológico, un cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma de timo, un timoma, un cáncer de tiroides metastásico, y un cáncer uterino.

[0024] La invención se refiere particularmente a tal uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico de cáncer, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular,

glioma, cáncer renal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón no de células pequeñas, cáncer ovárico, cáncer pancreático, un cáncer rectal, leucemia
5 mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML) leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de célula pilosa (HCL), neoplasia de célula dendrítica plasmacitoide blástica (BPDCN), linfomas de no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de célula del manto
10 (MLC), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, linfoma de Burkitt.

[0025] La invención se refiere además a las modalidades en las que cualquiera de las moléculas de unión a LAG-3 previamente descritas se marca de manera detectable y se usa
15 en la detección de LAG-3.

Breve Descripción de los Dibujos:

[0026] **La Figura 1** proporciona un esquema de un diacuerpo unido de forma covalente representativo que tiene dos sitios
20 de unión de epítipo compuestos por dos cadenas de polipéptidos, cada una con un Dominio de Promoción de Heterodímero E-hélice o K-hélice. Un residuo de cisteína puede estar presente en un conector y/o en el Dominio de

Promoción de Heterodímero como se muestra en la **Figura 3B**.

Los Dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado.

[0027] La **Figura 2** proporciona un esquema de una molécula
5 diacuerpo covalentemente unida representativa que tiene dos
sitios de unión de epítipo compuestos por dos cadenas de
polipéptidos, cada una con un Dominio CH2 y CH3, de modo que
las cadenas asociadas forman toda o parte de la Región de Fc.
Los Dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se
10 muestran usando el mismo patrón de sombreado.

[0028] Las **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas que muestran
diacuerpos tetravalentes representativos que tienen cuatro
sitios de unión de epítopos compuestos por dos pares de
cadenas de polipéptidos (es decir, cuatro cadenas de
15 polipéptidos en total). Un polipéptido de cada par posee un
Dominio CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas forman
toda o parte de una Región de Fc que comprende todo o parte
de una Región Fc ocurrente. Los Dominios VL y VH que
reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón
20 de sombreado. Los dos pares de cadenas de polipéptidos pueden
ser la misma. En tales modalidades en donde los Dominios VL y
VH reconocen diferentes epítopos (como se muestra en las
Figura 3C) la molécula resultante posee cuatro sitios de

unión de epítopo y es biespecífica y bivalente con respecto a cada epítopo unido. En tales modalidades en donde los Dominios VL y VH reconocen el mismo epítopo (*por ejemplo*, se usan las mismas CDR de Dominio de VL y las mismas CDR de Dominio de VH en ambas cadenas), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión de epítopo y es monoespecífica y tetravalente con respecto a un epítopo único. De forma alternativa, los dos pares de polipéptidos pueden ser diferentes. En tales modalidades en donde los Dominios VL y VH reconocen diferentes epítopos (como se muestra en las **Figuras 3C**) la molécula resultante es tetraespecífica y monovalente con respecto a cada epítopo unido. La **Figura 3A** muestra un diacuerpo Fc que contiene un Dominio de Promoción de Heterodímero péptido que comprende un residuo de cisteína. La **Figura 3B** muestra un diacuerpo que contiene la Región de Fc, que contiene Dominios de Promoción de Heterodímeros E-hélice y K-hélice que comprenden un residuo de cisteína y un conector (con un residuo de cisteína opcional). La **Figura 3C**, muestra un diacuerpo que contiene la Región de Fc, el cual contiene dominios CH1 y CL de anticuerpo.

[0029] Las **Figuras 4A y 4B** proporcionan esquemas de una molécula de diacuerpo covalentemente unida representativa que tiene dos sitios de unión a epítopo compuestos por tres

cadenas de polipéptidos. Dos de las cadenas de polipéptidos poseen un Dominio CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas de una Región Fc que comprende que comprenden toda o parte de una Región de Fc. Las cadenas de polipéptidos que
5 comprenden el Dominio VL y VH además comprenden un Dominios de Promoción de Heterodímeros. Los Dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado.

[0030] Las figuras 5A-5C muestran que MAb 1 de LAG-3 y MAb
10 6 de LAG-3 se unen a un epítipo que es distinto de un enlace por un anticuerpo de referencia MAb A de LAG-3. Los perfiles de unión de MAb 1 de LAG-3 marcado, MAb 6 de LAG-3 y MAb A de LAG-3 en ausencia de un anticuerpo competidor (Panel A), en presencia de un exceso de MAb 1 de LAG-3 (Panel B), el exceso
15 de MAb 6 de LAG-3 (Panel C), o LAG-3 mAbA (Panel D).

[0031] La figura 6 muestra que MAb 1 de LAG-3, MAb 2 de LAG-3, MAb 3 de LAG-3, MAb 4 de LAG-3, y MAb 5 de LAG-3, inhibir la unión LAG-3 (shLAG-3) humano soluble a MHC de clase II tal como se determina en un ensayo ELISA.

20 **[0032]** Las Figuras 7A-7C muestran que los anticuerpos aislados inhiben la unión de shLAG-3 a la superficie de MHC de clase II que expresan las células Daudi. El panel A muestra las curvas de inhibición de MAb 1 de LAG-3, MAb 2 de LAG-3,

MAb 3 de LAG-3, MAb 4 de LAG-3, MAb 5 de LAG-3, y el anticuerpo de referencia MAb A de LAG-3. El Panel B muestra las curvas de inhibición de MAb 1 de LAG-3, MAb 6 de LAG-3 y MAb A de LAG-3. El Panel C muestra las curvas de inhibición
5 de MAb 1 de LAG-3 y hLAG-3 1(1.4), hLAG 3-1 (1.2), hLAG-3 1 (2,2), hLAG-3 1 (1,1) humanizados. Cada panel representa un experimento separado.

[0033] Las figuras 8A-8C muestran que la expresión de LAG-3 está regulada positivamente en células T CD4 + estimuladas.
10 Análisis citométrico de flujo de LAG-3 de expresión en las células T CD4+ sin estimular (Panel A) y las células T CD4+ estimulada cuenta CD3 / CD28 de dos donantes diferentes (Paneles B y C) en el día 11 y 14, respectivamente. Todas las células se co-tiñeron con anticuerpo anti-CD4.

15 **[0034]** La figura 9A-9F muestran que los anticuerpos anti-LAG-3 aislados se unen a las células estimuladas, pero no células T no estimuladas. El análisis por citometría de CD3 / CD28 estimularon células T CD4 + (Paneles, A-C) y células T sin estimular CD4+ (paneles, D-F) marcadas con MAb 1 de LAG-3
20 (Paneles, A y D), MAb 2 de LAG-3 (Paneles, B y E), o MAb 3 de LAG-3 (paneles, C y F). Todas las células se co-tiñeron con anticuerpo anti-CD4.

[0035] Las figuras 10A-10D muestran que los anticuerpos aislados anti-LAG-3 se unen a las células estimuladas, pero no células T no estimuladas. El análisis por citometría de CD3 / CD28 estimulado células T CD4 + (Paneles, A-B) y las
5 células T sin estimular CD4 + (Paneles, C-D) marcadas con MAb 4 de LAG-3 (Paneles, A y C), o MAb 5 de LAG-3 (Paneles, B y D). Todas las células se co-tiñeron con anticuerpo anti-CD4.

[0036] Las figuras 11A-11F muestran que la expresión de LAG-3 y PD-1 está regulada positivamente en el antígeno
10 Staphylococcus aureus enterotoxin tipo B (SEB) estimulada por las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un donante representativo D: 34765. Análisis citométrico de flujo PBMCs estimuladas con SEB de un donante representativo de 48 horas después de la estimulación primaria (paneles, AB)
15 marcado con anticuerpos anti-LAG-3 / anti-CD3 (Panel A), o anticuerpos anti-CD3 / anti-PD-1 (Panel B) y en el quinto día posterior a la estimulación SEB- (Paneles, D-E) células tratadas con SEB solo (Grupo C) o con anticuerpo de control de isotipo (Panel D) durante la estimulación secundaria,
20 marcada con anticuerpos anti-LAG- 3 / anti-PD-1.

[0037] Las Figuras 12A-12F muestran que la expresión de LAG-3 y PD-1 está regulada positivamente en PBMC estimuladas con SEB de otro donante representativo D:53724. Análisis

cartométrico de flujo PBMCs estimuladas con SEB de un donante representativo de 48 horas después de la estimulación primaria (paneles, AB) marcado con anticuerpos anti-LAG-3 / anti-CD3 (Panel A), o anticuerpos anti-CD3 / anti-PD-1 (Panel B) y en el quinto día de estimulación post-SEB (paneles, D-E) células tratadas con SEB solo (Grupo C) o con anticuerpo de control de isotipo (Panel D) marcado con anticuerpos anti-LAG-3 / anti-PD-1.

[0038] La figura 13 muestra que MAb 1 de LAG-3 es capaz de estimular la producción de citosinas a niveles comparables al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1. IFN_γ (Panel A) y TNFα (Panel B), perfiles de secreción de PBMCs estimuladas con SEB tratados con anticuerpos anti-LAG-3 o anti-PD-1.

[0039] La Figura 14 muestra que MAb 1 de LAG-3 es capaz de estimular la producción de citosinas a niveles comparables al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 y que el tratamiento con MAb 1 de LAG-3 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 presentó el mayor aumento de la liberación de citosinas. Perfiles de secreción de IFN_γ a partir de PBMCs estimuladas con SEB tratados con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-1 solo y en combinación.

Descripción Detallada de la Invención:

[0040] La presente invención se dirige a Moléculas de Unión

a LAG-3 que comprenden el dominio de unión a LAG-3 de anticuerpos anti-LAG-3 seleccionados: mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 que son capaces de unirse tanto a LAG-3 de
5 mono cynomolgus como a LAG-3 humano. La invención se refiere de forma particular a moléculas de unión a LAG-3 que son versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o que comprende fragmentos de unión a LAG-3 de tales anticuerpos anti-LAG-3 (especialmente inmunoconjugados,
10 diacuerpos, los BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.). La invención se refiere de forma particular a tales moléculas de unión a LAG-3 que son adicionalmente capaces de unir un epítipo de una molécula que se involucra en la regulación de un punto de control inmune que se encuentra presente en la
15 superficie de una célula inmune. La presente invención también pertenece a métodos para utilizar tales moléculas de unión a LAG-3 para detectar LAG-3 o para estimular una respuesta inmune. La presente invención también pertenece a métodos de terapia de combinación en los cuales una molécula
20 de unión a LAG-3, que comprende uno o más dominios de unión a LAG-3 de los anticuerpos anti-LAG-3 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son efectivas en la estimulación de una respuesta inmune

para que de esta forma, se mejore, estimule o sobrerregule adicionalmente tal respuesta inmune en un sujeto.

I. Anticuerpos y sus dominios de Unión

5 **[0041]** Los anticuerpos de la presente invención son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse inmunoespecíficamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de por lo menos un sitio de reconocimiento de epítipo, 10 localizado en el Dominio Variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente, el término "**anticuerpo**" abarca anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, 15 anticuerpos policlonales, anticuerpos camélidos, Fvs (scFv) de una sola cadena, anticuerpos de una sola cadena, fragmentos F(ab'), Fvs biespecíficos enlazados por disulfuro (sdFv), intracuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos 20 incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un lugar de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo

(por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂) o subclase. En adición a sus usos conocidos en diagnosticos, anticuerpos han sido mostrados para ser mostrados en agentes terapéuticos y
5 útiles. Las últimas décadas han visto un resurgimiento de interés en el potencial terapéutico de los anticuerpos, y los anticuerpos se han convertido en una de las clases líderes de medicamentos biotecnológicos derivados (Chan, C.E. et al. (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious*
10 *Diseases*", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Se han aprobado para su uso más de 200 medicamentos basados en anticuerpos o están en desarrollo.

[0042] El término "**anticuerpo monoclonal**" se refiere a un anticuerpo de una población en donde el anticuerpo monoclonal
15 está compuesto de aminoácidos (ocurre naturalmente y no ocurre naturalmente) que son envueltos en la unión selectiva de un antígeno. Anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos en contra de un solo epítope (o sitio antigénico). El término "anticuerpo monoclonal"
20 engloba no únicamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud total, pero también fragmentos del mismo (tal como Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), cadena simple (scFv), mutaciones de la misma, que comprende

proteínas de fusión una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de
5 reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la habilidad de unir un antígeno. No se intenta ser limitativo en cuanto a la fuente del anticuerpo o la manera en la cuál es hecho (*por ejemplo*, por hibridoma, selección del fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El
10 término incluye todas las inmunoglobulinas así como los fragmentos etc. descritos en lo anterior bajo la definición de "anticuerpo". Los métodos de creación de anticuerpos son conocidos en la técnica. Un método que podría emplearse es el método de Kohler, G. et al. (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*",
15 Nature 256:495-497 o una modificación del mismo. Típicamente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se producen por la inmunización de un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos
20 celulares, o preparados proteicos que contienen el epítipo deseado. El inmunógeno puede ser, pero no se limita a, células primarias, cultivos de líneas celulares, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, o tejido.

Las células utilizadas para la inmunización pueden cultivarse por un intervalo de tiempo (*por ejemplo*, por lo menos 24 horas) previo a su uso en un inmunógeno. Las células se pueden usar como inmunógenos por sí mismas o en combinación con un adyuvante no desnaturalizante, tal como Ribí (véase, *por ejemplo*, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production", ILAR J. 37(3):119-125). En general, las células deben ser mantenidas intactas y de preferencia viables cuando se usen como inmunógenos. Las células intactas pueden permitir que el animal inmunizado detecte mejor los antígenos que las células rotas. El uso de adyuvantes desnaturalizantes o agresivos, *por ejemplo*, el adyuvante de Freud, puede romper células y por lo tanto se desaconseja. El inmunógeno se puede administrar en múltiples ocasiones, a intervalos periódicos tales como, dos veces por semana, o semanalmente, o se puede administrar de tal manera que se mantenga viabilidad en el animal (*por ejemplo*, en un tejido recombinante). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales existentes y cualquier otro anticuerpo equivalente que son inmuno-específicos para un epítipo patogénico deseado se pueden secuenciar y producir de forma recombinante por cualquier método conocido en la técnica. En una modalidad, tal anticuerpo se somete a secuenciación y la

secuencia de polinucleótido entonces se clona en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica al anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para un uso futuro. La secuencia polinucleótida de tales anticuerpos puede usarse para manipulación genética para generar las moléculas monoespecíficas o multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas y tetraespecíficas) de la invención, así como también una afinidad optimizada, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y/o un anticuerpo caninizado, para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. El principio general en humanizar un anticuerpo envuelve en retener la secuencia básica de la porción de unión de antígeno del anticuerpo, mientras se intercambia el remanente no-humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpo humano.

[0043] Anticuerpos naturales (tales como anticuerpos IgG) se componen de dos **Cadenas Ligeras** con complejos de dos **Cadenas Pesadas**. Cada cadena ligera contiene un Dominio Variable (**VL**) y un Dominio Constante (**CL**). Cada cadena pesada contiene un Dominio Variable (**VH**), tres Dominios Constantes (**CH1**, **CH2** y **CH3**), y un Dominio de bisagra localizado entre los Dominios **CH1** y **CH2**. La unión estructural básica de

inmunoglobulinas de origen natural (*por ejemplo*, IgG) es de esta manera un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, usualmente expresado como una glicoproteína de aproximadamente 150,000 Da. La porción amino-terminal ("N-terminal") de cada cadena incluye un Dominio Variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son primariamente responsables del reconocimiento de antígeno. La porción de carboxilo terminal ("C-terminal") de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un único Dominio Constante y cadenas pesadas que tienen usualmente tres Dominios Constantes y un Dominio Bisagra. De esta manera, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula IgG es n-VL-CL-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (donde n y c representan respectivamente N-término y el C- término del polipéptido). Los Dominios Variables de una molécula IgG consisten de regiones determinantes de complementariedad (**CDR**), que contienen los residuos en contacto con epítipo, y segmentos no CDR, denominados como segmentos de estructura (**FR**), que en general mantienen la estructura y determinan la colocación de bucles de CDR para permitir tal contacto (aunque ciertos residuos de estructura pueden también contactar antígeno). De esta manera, los Dominios V_L y V_H

tiene la estructura n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de un anticuerpo de Cadena Ligera se designan en la presente respectivamente como **Dominio CDR_L1**,
5 **Dominio CDR_L2**, y **Dominio CDR_L3**. De manera similar, los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de un anticuerpo de cadena pesada son designados en la presente respectivamente **Dominio CDR_H1**,
10 **Dominio CDR_H2**, y **Dominio CDR_H3**. De esta manera, los términos Dominio CDR_L1, Dominio CDR_L2, Dominio CDR_L3, Dominio CDR_H1, Dominio CDR_H2, y Dominio CDR_H3 se dirigen a polipéptidos que cuando se incorporan en una proteína causan que la proteína sea capaz de unirse a un epítipo específico a pesar de si tal proteína es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas
15 o un diacuerpo o una molécula de unión de una sola cadena (*por ejemplo*, una scFv, una BiTe, etc.), o es otro tipo de proteína.

[0044] La invención particularmente engloba fragmentos de una sola cadena de Dominio Variable ("**scFv**") de los
20 anticuerpos anti-LAG-3 de esta invención y moléculas de unión multiespecíficas que comprenden la misma. Los fragmentos de Dominio Variable de una sola cadena son hechos uniendo Dominios Variables de cadena Ligera y/o Pesada usando un

péptido de cadena corta. Bird et al. (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426) describe un ejemplo de péptidos de unión con un puente de aproximadamente 3.5 nm entre el término carboxilo de un Dominio Variable y el término amino del otro Dominio Variable. Se han diseñado y
5 utilizado conectores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426). Los conectores a su vez se pueden modificar para funciones adicionales, tales como unión de medicamentos o
10 unión de soportes sólidos. Las variantes de una sola cadena se pueden producir ya sea por recombinación o por síntesis. Para la producción sintética de scFv, se puede usar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, se puede introducir un plásmido adecuado que contiene
15 polinucleótido y codifica el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, tal como células de levadura, planta, insectos o mamíferos, o procariota, tal como E. coli. Se pueden elaborar Polinucleótidos que codifican el scFv de interés por manipulaciones rutinarias tales como ligación de
20 polinucleótidos. El scFv resultante se puede aislar usando técnicas estándar de purificación de proteína conocidas en la técnica.

[0045] La invención abarca particularmente variantes humanizadas de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención y moléculas de unión multiespecífica que comprenden los mismos. El término anticuerpo "humanizado" se refiere a una molécula

5 quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión de epítipo de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina remanente de la molécula que se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. Los

10 anticuerpos LAG-3 anti-humano de la presente invención incluyen variantes humanizadas, quiméricas o caninizadas de anticuerpor mAb1 de LAG-3, mAb2 de LAG-3, mAb3 de LAG-3, mAb4 de LAG-3, mAb5 de LAG-3, mAb6 de LAG-3. Se puede usar una secuencia de polinucleótido que codifica el dominio variable

15 de un anticuerpo para generar tales derivados y para mejorar la afinidad, u otras características de tales anticuerpos. El principio general en la humanización de un anticuerpo involucra retener la secuencia básica de la porción de unión de epítipo del anticuerpo, mientras se intercambia el

20 remanente no humano del anticuerpo por secuencias de anticuerpo humano. Existen cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar el nucleótido y predecir la secuencia de aminoácido de los

dominios variables pesados y ligeros del anticuerpo iniciador
(2) diseñar el anticuerpo humanizado o el anticuerpo
caninizado, es decir, decidir cuál región de estructura de
anticuerpo se usará durante el proceso de humanización o
5 canonización (3) las metodologías/técnicas actuales de
humanización o caninización y (4) la transfección y expresión
del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes
de los Estados Unidos Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; y
6,331,415.

10 **[0046]** El sitio de unión de antígeno puede comprender
dominios variables completos fusionados en dominios
constantes o sólo las CDR injertadas en regiones de
estructura apropiadas en los dominios variables (CDRs)
injetados en regiones de marco apropiado en dominios
15 variables. Los sitios de unión de antígenos pueden ser de
tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de
aminoácido. Esto elimina la región constante como un
inmunógeno en individuos humanos, pero permanece la
posibilidad de una respuesta inmune para la región variable
20 extraña (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric
Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response",
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Otro
procedimiento se enfoca no sólo en suministrar regiones

humano-derivadas constantes, sino también en modificar las regiones variables de modo que se remodelen lo más parecido posible a la forma humana. Se conoce que los dominios variables de ambas cadenas ligera y pesada contienen tres
5 regiones determinantes complementarias (CDRs) las cuales varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinación de capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones de estructura (las FR) que se conservan relativamente en una especie dada y que putativamente
10 proporcionan un andamio para las CDRs. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, las regiones variables pueden ser "remodeladas" o "humanizadas" al injertar las CDR derivadas de un anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano a ser
15 modificado. La aplicación de esta aproximación a varios anticuerpos se ha reportado por Sato, K. et al. (1993) "Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth", Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for
20 Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-

Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", Human Antibodies Hybridoma 2:124-
5 134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et
10 al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And
15 Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", J. Immunol. 148:1149-1154. En algunas modalidades, anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de ratón que contiene las 6 CDR de los anticuerpos de ratón). En otras modalidades,
20 anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que se alteran en sus secuencias de aminoácidos relativas al anticuerpo original.

[0047] Se ha descrito un número de moléculas de anticuerpo

"humanizado" que comprenden un sitio de unión de epítopo derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen Dominio Variable de roedor o modificado de roedor y sus regiones determinantes de complementariedad asociadas (las CDR) fusionadas a Dominios Constantes humanos (véase, por ejemplo, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies", Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen", J. Immunol. 138:4534-4538, and Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody", Cancer Res. 47:3577-3583). Otras referencias describen CDR de roedor injertados en una región de estructura (FR) de soporte humana previo a su fusión con un Dominio constante humano apropiado (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239:1534-1536; y Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human

Antibody With Those From A Mouse", Nature 321:522-525). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones de estructura de roedor revestidas por recombinación. Véase, por ejemplo, Publicación de Patente Europea No. 519,596. Estas

5 moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar una respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo antihumanas de roedor, lo que limita la duración y efectividad de aplicaciones terapéuticas de estas porciones en receptores humanos. Otros métodos de humanización de

10 anticuerpos que pueden utilizarse también se describen por Daugherty et al. (1991) "*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*", Nucl. Acids Res. 19:2471-

15 2476 y en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; y 5,866,692.

II. Receptores Fc γ (Fc γ Rs)

[0048] Los Dominios CH2 y CH3 de las dos cadenas pesadas

20 interactúan para formar la **Región de Fc**, que es un dominio que se reconoce por los **Receptores Fc** celulares que incluyen pero no limitan a Receptores Fc gamma (**Fc γ Rs**). Como se utiliza en la presente, el término "Región de Fc" se usa para

definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG1 humana ejemplar es (**SEQ ID NO:22**):

```

231    240    250    260    270    280
5  APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
    290    300    310    320    330
    GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
    340    350    360    370    380
    PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
10    390    400    410    420    430
    WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
    440    447
    ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

[0049] La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG2 humana ejemplar es (**SEQ ID NO:23**):

```

231    240    250    260    270    280
15 APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
    290    300    310    320    330
    GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
    340    350    360    370    380
20    PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
    390    400    410    420    430
    WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE

```

440 447

ALHNHYTQKS LSLSPGX

[0050] La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG3 humana ejemplar es(**SEQ ID NO:27**) :

5 231 240 250 260 270 280
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 340 350 360 370 380
 10 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE
 440 447

ALHNRFTQKS LSLSPGX

15 **[0051]** La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG4 humana ejemplar es(**SEQ ID NO:24**) :

231 240 250 260 270 280
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 290 300 310 320 330
 20 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 340 350 360 370 380
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430

WESNGQPENN YKTTPPVLD S DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

440 447

ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

[0052] A través de la presente especificación, la
 5 numeración de los residuos en la región constante de una
 cadena pesada de IgG es aquella del Índice de la Unión
 Europea de acuerdo con Kabat et al., Sequences of Proteins of
 Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD
 (1991) ("**Kabat**"), se incorporan expresamente en la presente
 10 para referencia. El "índice de la unión europea de acuerdo
 con Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo de la
 IgG1 humana de la Unión Europea. Los aminoácidos de los
 Dominios Variables de las cadenas maduras pesada y ligera de
 inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido
 15 en la cadena, y las CDR se identifican como se define por
 Kabat (se entenderá que la CDR_{H1} como se define por Chothia,
 C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the
 hypervariable regions of immunoglobulins*". J. Mol. Biol.
 196:901-917) comienza cinco residuos antes). Kabat describe
 20 números de secuencias de aminoácidos para anticuerpos,
 identifica una secuencia de consenso de aminoácidos para cada
 subgrupo, y asigna un número de residuo para cada aminoácido.
 El esquema de numeración de Kabat se extiende a anticuerpos

no incluidos en este compendio por alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso de Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. Este método para asignar números de residuo se ha vuelto estándar en el campo e identifica de forma rápida aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, incluyendo variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de la cadena ligera de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente de un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo de ratón.

[0053] Se han observado polimorfismos en un número de posiciones diferentes dentro de las regiones constantes del anticuerpo (*por ejemplo*, posiciones Fc, que incluyen pero no se limitan a posiciones, 270, 272, 312, 315, 356, y 358 como se enumera por el Índice de la Unión Europea de acuerdo con Kabat), y de esta manera pueden existir pocas diferencias entre la secuencia presentada y secuencias en la técnica anterior. Se han caracterizado bien formas polimórficas de inmunoglobulinas humanas. En la actualidad, se conocen 18 Gm alotipos: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular

Analysis Of Structure, Function And Regulation". Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Se contempla específicamente que a los anticuerpos de la presente invención se les puede incorporar cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina, y no se limita al alotipo, isoalotipo o haplotipo de las secuencias proporcionadas en la presente. Además, en algunos sistemas de expresión el residuo de aminoácido del C-terminal (en negritas arriba) del Dominio CH3 puede ser removido post translacionalmente. Por consiguiente, el residuo de C-terminal del dominio CH3 es un residuo opcional en las moléculas de unión a LAG-3 de la invención. Específicamente se abarcan por la invención actual las moléculas de unión a LAG-3 que carecen del residuo de C-terminal del Dominio CH3. También se abarcan específicamente por la invención actual tales constructos que comprenden el residuo de lisina C-terminal del Dominio CH3.

[0054] Las señales de activación y de inhibición se transducen a través de la ligación de una Región de Fc a un Receptor Fc Celular (FcγR). La capacidad de tal ligación para resultar en funciones diametralmente opuestas es el resultado de diferencias estructurales entre diferentes isoformas de receptor. Dos distintos dominios dentro de los dominios de

señalización citoplásmicos del receptor llamados motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptores (los ITAM) y el motivo de inhibición basado en tirosina (los ITIM) se contabilizan para las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplásmicas para estas estructuras dicta el resultado de las respuestas mediadas por células FcγR. Los ITAM que contienen complejos FcγR incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los ITIM que contienen complejos sólo incluyen FcγRIIB. Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA mediante complejos inmunes o unión cruzada específica de anticuerpos sirve para agregar los ITAM junto con cinasas de receptor asociado lo que facilita la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para Syk cinasa, de tal activación resulta la activación de sustratos posteriores (por ejemplo, PI₃K). La activación celular lleva a la liberación de mediadores proinflamatorios. El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico al FcγRIIA y un complejo IgG en una manera imperceptible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibitoria de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando está coligado junto con

un FcγR de activación, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como una consecuencia de la activación de tirosina
5 cinasa mediada por ITAM que contienen FcγR, y por consiguiente previenen la afluencia de Ca⁺⁺ intracelular. De esta manera, la unión cruzada de FcγRIIB disminuye la respuesta de activación para ligación FcγR e inhibe la sensibilidad celular. De esta manera se aborta la activación
10 de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos.

III. Anticuerpos Biespecíficos, Diacuerpos Multiespecíficos y diacuerpos DART®

15 **[0055]** La capacidad de un anticuerpo para unir un epítipo de un antígeno depende de la presencia y la secuencia de aminoácidos de los Dominios VL y VH del anticuerpo. La interacción de un anticuerpo de cadena ligera y de un anticuerpo de cadena pesada y en particular, la interacción
20 de sus Dominios VL y VH forma una de los dos sitios de unión del epítipo de un anticuerpo natural. Los anticuerpos naturales son capaces de unirse a una sola especie de epítipo (*es decir*, son monoespecíficos), aunque pueden unir múltiples

copias de esa especie (*es decir*, exhiben bivalencia o multivalencia).

[0056] Los dominios de unión de la presente invención se unen a epítomos en una manera "**inmunoespecífica**". Como se utiliza en la presente, un anticuerpo, diacuerpo u otra molécula de unión a epítomo se dice que une "**inmunoespecíficamente**" (o que exhibe una unión "**específica**" con) una región de otra molécula (*es decir.*, un epítomo) si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápido, con mayor duración y/o con mayor afinidad con aquél epítomo relativo para epítomos alternativos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un epítomo de LAG-3 es un anticuerpo que se une con tal epítomo de LAG-3 con mayor afinidad, avidez, más rápido, y/o con mayor duración que si se uniera a otro epítomo de LAG-3 o con un epítomo no de LAG-3. También se entenderá al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítomo) que se une inmunoespecíficamente a un primer objetivo puede o no unirse de forma específica o preferencial a un segundo objetivo. Como tal "unión inmunoespecífica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. De forma general, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión "específica". Se dice que dos moléculas son capaces de unirse

una a la otra en una manera "**fisioespecífica**", si dicha unión muestra la especificidad con la cual se unen los receptores con sus respectivos ligandos. La capacidad de un anticuerpo para unirse inmuno-específicamente con un epítopo puede
5 determinarse a través de, por ejemplo, un inmunoensayo.

[0057] La funcionalidad de los anticuerpos se puede mejorar por la generación de moléculas multiespecíficas basadas en anticuerpos que pueden unir simultáneamente dos antígenos separados y diferentes (o epítomos diferentes del mismo
10 antígeno) y/o por la generación de una molécula basada en anticuerpo que tiene una valencia mayor (*es decir*, más de dos sitios de unión) para el mismo epítopo y/o antígeno.

[0058] La funcionalidad de los anticuerpos se puede mejorar por la generación de moléculas multiespecíficas basadas en anticuerpos que pueden unir simultáneamente dos antígenos separados y diferentes (o epítomos diferentes del mismo
15 antígeno) y/o por la generación de una molécula basada en anticuerpo que tiene una valencia mayor (*es decir*, más de dos sitios de unión) para el mismo epítopo y/o antígeno.

20 [0059] Para proporcionar moléculas que tengan mayor capacidad que los anticuerpos naturales, se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de recombinación específica de anticuerpos (*véase, por ejemplo*, Publicaciones de PCT Nos.

WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), la mayoría de los cuales utiliza péptidos conectores ya sea para fusionar una proteína adicional de unión de epítipo (*por ejemplo*, un scFv, VL, VH, *etc.*) a, o dentro del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), o para fusionar múltiples fragmentos de unión de epítipo (*por ejemplo*, dos fragmentos Fab o scFvs). Formatos alternativos utilizan péptidos conectores para fusionar un fragmento de unión de epítipo (*por ejemplo*, un scFv, VL, VH, *etc.*) con un dominio de dimerización tal como el dominio CH2-CH3 o polipéptidos alternativos (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Típicamente, tales aproximaciones involucran compromisos y compensaciones. Por *ejemplo*, las publicaciones de PCT Nos. WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 describen que el uso de conectores puede causar problemas en configuraciones terapéuticas, y enseña un anticuerpo triespecífico en el cual los Dominios CL y CH1 están conmutados de sus respectivas posiciones naturales y los Dominios VL y VH se han diversificado (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitirles unir más de un antígeno. De esta manera, las moléculas descritas en estos documentos intercambian

especificidad de unión por la capacidad de unir especies adicionales de antígeno. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2013/163427 y WO 2013/119903 describen la modificación del Dominio CH2 para contener un aducto de fusión de proteína que
5 comprende un dominio de unión. El documento menciona que probablemente el Dominio CH2 juega un papel mínimo en la mediación de la función efectora. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 describen anticuerpos cuyas Regiones de Fc se han reemplazado con
10 Dominios VL y VH adicionales, de modo que formen moléculas de unión trivalentes. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2003/025018 y WO2003012069 describen diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen Dominios scFv. La Publicación de PCT No. WO 2013/006544 describe moléculas Fab
15 multivalentes que se sintetizan como una sola cadena de polipéptidos y luego se somete a proteólisis para producir estructuras heterodiméricas. De esta manera, las moléculas descritas en estos documentos intercambian toda o parte de su capacidad de mediar la función efectora por la capacidad para
20 unir especies adicionales de antígeno. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO

1991/003493 describen agregar dominios de unión adicionales o grupos funcionales para un anticuerpo o una porción de anticuerpo (*por ejemplo*, agregar un diacuerpo a la cadena ligera del anticuerpo, o agregar Dominios VL y VH adicionales a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o agregar proteínas de fusión heterólogas o encadenando múltiples Dominios Fab entre sí). De esta manera, las moléculas descritas en estos documentos intercambian estructuras de anticuerpo nativo por la capacidad para unir especies adicionales de antígeno.

[0060] La técnica menciona adicionalmente la capacidad para producir **diacuerpos** que difieren de tales anticuerpos naturales en su capacidad de unir dos o más especies de epítipo diferentes (*es decir*, exhiben bioespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (véase, *por ejemplo*, Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor

Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781
(Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent
Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific
Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting
5 Applications", Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et
al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single
Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable
Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano
et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its
10 Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain",
Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al.
(2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant
Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng.
13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-
15 Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res.
69(12):4941-4944).

[0061] El diseño de un diacuerpo se basa en el derivado de
anticuerpo conocido como un fragmento de Dominio Variable de
una sola cadena (**scFv**). Tales moléculas se hacen por la unión
20 de Dominios Variables de cadena Ligera y/o Pesada usando un
péptido de unión corto. Los conectores a su vez se pueden
modificar para funciones adicionales, tales como unión de
medicamentos o unión de soportes sólidos. Las variantes de

una sola cadena se pueden producir ya sea por recombinación o por síntesis. Para la producción sintética de scFv, se puede usar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, se puede introducir un plásmido adecuado que contenga un polinucleótido que codifique el scFv en una célula huésped, ya sea eucariota, tal como células de levadura, planta, insecto o mamífero, o procariotas, tal como *E. coli*. Se pueden elaborar Polinucleótidos que codifican el scFv de interés por manipulaciones rutinarias tales como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante se puede aislar usando técnicas estándar de purificación de proteína conocidas en la técnica.

[0062] La provisión de diacuerpos no específicos proporciona una ventaja significativa sobre los anticuerpos, que incluyen pero no se limitan a, la capacidad para coligar y co-localizar células que expresan diferentes epítomos. Los Diacuerpos Bioespecíficos tienen, de esta forma, aplicaciones de amplio alcance incluyendo terapia e inmunodiagnóstico. La Bioespecificidad permite una gran flexibilidad en el diseño e ingeniería del diacuerpo en varias aplicaciones, proporciona una avidéz mejorada por antígenos multinuméricos, la reticulación de antígenos diferentes, y una selección directa para tipos de células específicas que dependen de la

presencia de ambos antígenos objetivo. Debido a su valencia aumentada, bajas tasas de disociación y rápida eliminación de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, de o por debajo de ~50 kDa), moléculas de diacuerpo conocidas en la
5 técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la formación de imagen de tumor (Fitzgerald et al. (1997) *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris"*, Protein Eng. 10:1221).

[0063] La bioespecificidad de diacuerpos ha llevado a su
10 uso para coligar células diferentes, por ejemplo, la reticulación de células T citotóxicas con células tumorales (Staerz et al. (1985) *"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells"*, Nature 314:628-631, y Holliger et al. (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-
15 Cells Mediated By A Bispecific Diabody"*, Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) *"Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies"*, Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden usar diacuerpos biespecíficos para coligar receptores en la superficie de
20 células diferentes o en una sola célula. La coligación de diferentes células y/o receptores es útil para modular las funciones efectoras y/o la señalización de células inmunes. Se puede dirigir moléculas multiespecíficas (por ejemplo,

diacuerpos biespecíficos) que comprenden sitios de unión de epítomos hacia una superficie de cualquier célula inmune tal como B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80
5 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), Galactina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), Receptor de Activación de Exterminación (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L),
10 PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), y/o VISTA (PD-1H), que se expresan en linfocitos T, Células Naturales Exterminadoras (NK), células que presentan Antígeno u otras células mononucleares. En particular, los
15 sitios de unión de epítomos dirigidos a una superficie celular de receptor que está involucrada en la regulación de un punto de control inmune(o el ligando del mismo), son útiles en la generación de moléculas de unión biespecíficas o multiespecíficas que antagonizan o bloquean la señalización
20 inhibitoria de moléculas de punto de control inmunes y por consiguiente estimulan, sobre-regulan o mejoran, la respuesta inmune en un sujeto. Las moléculas involucradas en regular los puntos de control inmunes incluyen pero no se limitan a

B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galactina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR,
5 SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 y/o VISTA.

[0064] Sin embargo, las ventajas anteriores traen consigo costos considerables. La formación de tales diacuerpos no monoespecíficos requiere el ensamble exitoso de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (*es decir*, tal formación
10 requiere que los diacuerpos se formen a través de heterodimerización de diferentes cadenas de polipéptidos). Este hecho está en contraste con los diacuerpos monoespecíficos, que se forman a través de la homodimerización de cadenas de polipéptidos idénticas. Debido
15 a que al menos dos polipéptidos disímiles (*es decir*, dos especies de polipéptidos) deben suministrarse para formar un diacuerpo no específico, y porque la homodimerización de tales polipéptidos conduce a moléculas inactivas (Takemura, S.
et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant
20 Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de tales polipéptidos debe ser realizada de tal modo que se evite el enlace covalente entre polipéptidos de la misma especie (*es decir*, de modo que se

prevenga la homodimerización) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). La técnica por lo tanto ha enseñado la asociación no
5 covalente de tales polipéptidos (véase, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And
10 Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human
15 Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

[0065] Sin embargo, la técnica ha reconocido que diacuerpos
20 diespecíficos compuestos por polipéptidos asociados de manera no covalente son inestables y se disocian de inmediato en monómeros no funcionales (véase, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific

Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

[0066] Ante este desafío, la técnica ha tenido éxito en
5 desarrollar diacuerpos monoespecíficos heterodiméricos unidos
covalentemente estables, llamados diacuerpos **DART®** (**Reactivos
Reseleccionadores de Afinidad Dual**); véase, por ejemplo,
Publicaciones de Patente de los Estados Unidos No. 2013-
0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente
10 Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y
Publicaciones de PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO
2010/080538; WO 2008/157379; WO 2006/113665 y Sloan, D.D. et
al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells
by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV
15 Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells", PLoS Pathog.
11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al
Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-
Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform",
Blood 127(1):122-131; Chichili, G.R. et al. (2015) "A
20 CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To
Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In
Nonhuman Primates", Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore,
P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting

Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", J. Mol. Biol. 399(3):436-449; Marvin, J.S. et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658; Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Holliger, P. et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448. Tales diacuerpos comprenden dos o más complejos covalentes de polipéptidos e involucran la ingeniería de uno o más residuos de cisteína en cada especie utilizada de polipéptido que permita que se formen uniones de disulfuro y por consiguiente unir de manera covalente dos cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la adición de un residuo de cisteína al C-terminal de tales

constructos ha mostrado permitir uniones de disulfuro entre las cadenas de polipéptidos, estabilizando el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

5 **[0067]** Cada uno de los dos diacuerpos de polipéptidos biespecíficos **DART®** más simples comprende tres dominios. El primer polipéptido comprende (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un Primer Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Ligera de una primera
10 inmunoglobulina (VL1), (ii) un Segundo Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), y (iii) un Tercer Dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un Dominio de Promoción de Heterodímeros
15 que sirve para promover la heterodimerización del diacuerpo y unir de forma covalente el primer y segundo polipéptidos del diacuerpo entre sí. El segundo polipéptido contiene (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un Primer Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de
20 Cadena Ligera de una primera inmunoglobulina (VL2), (ii) un Segundo Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un Tercer Dominio que contiene

un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un Dominio de Promoción de Heterodímeros complementario que forma complejos con el Dominio de Promoción de Heterodímeros de la primera cadena de polipéptidos para promover la heterodimerización de la primera cadena de polipéptidos. El
5 residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) del tercer dominio de la segunda cadena de polipéptidos sirve para promover la unión covalente de la segunda cadena de polipéptidos a la primera cadena de polipéptidos del
10 diacuerpo. Tales moléculas son estables, potentes y tienen la capacidad de unir simultáneamente dos o más antígenos. En una modalidad, los Terceros Dominios del primer y segundo polipéptidos contienen cada uno un residuo de cisteína, que sirve para unir los polipéptidos mediante un enlace de
15 disulfuro. La **Figura 1** proporciona un esquema de tal diacuerpo, que utiliza dominios promotores de Heterodímero E-hélice/K-hélice y una cisteína que contiene un conector para unión covalente. Como se proporciona en las **Figuras 2-3**, uno o ambos polipéptidos pueden poseer adicionalmente la
20 secuencia de un dominio CH2-CH3, de modo que la formación de complejos entre los dos polipéptidos del diacuerpo forma una Región de Fc que es capaz de unirse al receptor Fc de células (tales como B linfocitos, células dendríticas, células

exterminadoras naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos). Como se proporciona con más detalle a continuación, los Dominios CH2 y/o CH3 de tales cadenas de polipéptidos no necesitan ser idénticas en
5 secuencia, y se modifican ventajosamente para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas de polipéptidos.

[0068] Se han descrito muchas variaciones de tales moléculas (véase, *por ejemplo*, Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos No. 2015/0175697; 2014/0255407;
10 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 y 2009/0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Estas Regiones de Fc que contienen diacuerpos **DART®** pueden comprender dos
15 pares de cadenas de polipéptidos. La primera cadena de polipéptidos comprende (en dirección N-terminal a C-terminal): (i) un Primer Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Ligera de una primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un Segundo Dominio que comprende
20 una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), y (iii) un Tercer Dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y sirve para promover la

heterodimerización con el segundo polipéptido del diacuerpo y unir de forma covalente el primer y segundo polipéptidos del diacuerpo entre sí, y (iv) un dominio CH2-CH3. El segundo polipéptido contiene (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un Primer Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Ligera de una segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un Segundo Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un Tercer Dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un Dominio de Promoción de Heterodímeros que promueve la heterodimerización con la primera cadena de polipéptidos. Aquí, dos primeros complejos de polipéptidos reaccionan entre ellos para formar una Región de Fc. Las **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas de tres variaciones de tales diacuerpos que utilizan diferentes Dominios Promotores de Heterodimerización. Otras regiones que contienen diacuerpos DART® pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer polipéptido de tales diacuerpos DART® contiene tres dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. El segundo polipéptido de tal diacuerpo DART® contiene: (i) un Dominio que contiene VL2,

(ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y unión covalente con la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo. El tercer polipéptido de tales diacuerpos DART® comprende una secuencia
5 CH2-CH3. De este modo, la primera y segunda cadena de polipéptidos de tales diacuerpos DART® se asocian juntos para formar un sitio de unión a VL1/VH1 que es capaz de unirse al primer epítipo, así como un sitio de unión a VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítipo. Tales moléculas DART® más
10 complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo unido de manera covalente. De esta manera, el primer y segundo polipéptidos se unen entre sí a través de un enlace disulfuro que involucra residuos de cisteína en sus Terceros Dominios respectivos. En
15 particular, la primera y tercera cadena de polipéptidos forman complejos entre sí para formar una Región de Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Las **Figuras 4A-4B** proporcionan esquemas de tales diacuerpos que comprenden tres cadenas de polipéptidos.

20 **[0069]** Se conocen en la técnica constructos alternativos para aplicaciones donde se desea una molécula tetravalente pero no se requiere una Fc, incluyendo sin limitar a, anticuerpos tetravalentes en tándem, también llamados

"**TandAbs**" (véase, *por ejemplo* Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; Publicaciones de Patentes Europeas Nos. EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 y EP 1293514; 5 Publicaciones de PCT Nos. WO 1999/057150, WO 2003/025018, y WO 2013/013700) que se forman por la homodimerización de dos cadenas idénticas cada una posee un Dominio VH1, VL2, VH2, y VL2.

10 **IV. Moléculas de Unión a LAG-3 Anti-humano de la Presente**
Invención

[0070] Las moléculas de unión a LAG-3 preferidas de la presente invención incluyen anticuerpos, diacuerpos, BiTEs, etc. y son capaces de unirse a una porción continua o 15 discontinua (*por ejemplo*, conformacional) (**epítipo**) de LAG-3 humano. Las moléculas de unión de LAG-3 de la presente invención de preferencia también exhibirán la capacidad para unirse a moléculas de LAG-3 de una o más especies no humanas, en particular, especies de primates (y especialmente a una 20 especie de primates, tal como *mono cynomolgus*). Un polipéptido de LAG-3 humano representativo (NCBI Secuencia NP_002277.4; incluyendo una secuencia de señal de 22 residuos de aminoácidos (que se muestra subrayado) y la proteína

madura de residuo de aminoácidos 503) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:1**):

MWEAQFLGLL **FLQPLWVAPV** **KPL**QPGA EVP VVWAQEGAPA QLPCSP TIPL
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
 5 VLSVGP GGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
 HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
 PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCH IHLQEQ QLNATVTLAI
 10 ITVTPKSFGS PGS LGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
 LLFLILGVLS LLLLV TGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
 ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

[0071] En ciertas modalidades las moléculas de unión de
 15 LAG-3 de la invención se caracterizan por cualquiera (uno o
 más) de los siguientes criterios:

(1) una específicamente LAG-3 humano como se
 expresa de forma endógena en la superficie de una célula T
 humana estimulada;

20 (2) una específicamente LAG-3 humano con una
 constante de equilibrio de unión (K_D) de 40 nM o menos;

(3) una específicamente LAG-3 humano con una
 constante de equilibrio de unión (K_D) de 0.5 nM o menos;

(4) une específicamente LAG-3 de primate no humano(*por ejemplo*, LAG-3 de mono cynomolgus);

(5) inhibe (*es decir*, bloquea o interfiere con) la unión de LAG-3 con MHC clase II;

5 (6) estimula una respuesta inmune;

(7) estimula una respuesta de célula T de antígeno específico como un agente único;

(8) se sinergiza con un anticuerpo anti PD-1 para estimular una respuesta de célula T de antígeno específico;

10 (9) une el mismo epítipo de LAG-3 como mAb 1 de LAG 3 o mAb 6 de LAG-3 l del anticuerpo anti-LAG-3 y/o

(10) no compite con el anticuerpo anti-LAG-3 257F (BMS 986016, Medarex/BMS) para unión de LAG-3 (*por ejemplo*, como se mide por Análisis Biacore).

15 **[0072]** Como se utiliza en la presente el término "respuesta de célula T de antígeno específico" se refiere a respuestas de una célula T que resultan de la estimulación de la célula T con el antígeno para el cual la célula T es específica. Ejemplos no limitantes de respuestas de una célula T
20 específica hacia una estimulación con antígeno incluyen la producción y proliferación de citocina (*por ejemplo*, producción de TNF- α , IFN- γ). La habilidad de una molécula para estimular una respuesta de células T específica de

antígeno se puede determinar, por ejemplo, usando el análisis de PBMC (SEB)-estimuladas por el antígeno tipo B de Enterotoxina de *Staphylococcus aureus*.

[0073] Las moléculas de unión a LAG-3 preferidas de la presente invención poseen los dominios VH y/o VL de anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 de murino "mAb 1 de LAG 3", "mAb 2 de LAG 3", "mAb 3 de LAG-3", "mAb 4 de LAG-3", "mAb 5 de LAG-3", y/o "mAb 6 de LAG-3" y de mayor preferencia posee 1, 2 o las 3 CDR_Hs del Dominio VH y/o 1, 2 o las 3 CDR_Ls del Dominio VL de tales anticuerpos monoclonales anti-LAG-3. Tales moléculas de unión a LAG-3 anti-humano preferidas incluyen anticuerpos biespecíficos (o multiespecíficos), anticuerpos quiméricos o humanizados, BiTes, diacuerpos, etc, y tales moléculas de unión tienen Regiones de Fc variables.

[0074] La invención se refiere particularmente a moléculas de unión a LAG-3 que comprenden un dominio de unión a LAG-3 que posee:

(A) (1) las tres CDR_H del Dominio VH del anticuerpo anti-LAG-3 del mAb 1 de LAG 3, o VL4 de mAb 1 de hLAG-3;

(2) las tres CDR_H del Dominio VL del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(3) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR_L del Dominio VL del

mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(4) el Dominio VH del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(5) el Dominio VL del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo
5 anti-LAG-3;

(6) los Dominios VH y VL del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(B) (1) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 2 de LAG 3 del anticuerpo anti-LAG-3;

10 (2) las tres CDR_H del Dominio VL del mAb 2 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(3) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 2 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR_L del Dominio VL del mAb 2 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

15 (4) el Dominio VH del mAb 2 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(5) el Dominio VL del mAb 2 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(6) los Dominios VH y VL del mAb 2 de LAG-3 del
20 anticuerpo anti-LAG-3;

(C) (1) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 3 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(2) las tres CDR_H del Dominio VL del mAb 3 de LAG-3

del anticuerpo anti-LAG-3;

(3) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 3 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR_L del Dominio VL del mAb 3 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

5 (4) el Dominio VH del mAb 3 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(5) el Dominio VL del mAb 3 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(6) los Dominios VH y VL del mAb 3 de LAG-3 del
10 anticuerpo anti-LAG-3;

(D) (1) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(2) las tres CDR_H del Dominio VL del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

15 (3) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR_L del Dominio VL del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(4) el Dominio VH del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

20 (5) el Dominio VL del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(6) los Dominios VH y VL del mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(E) (1) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(2) las tres CDR_H del Dominio VL del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

5 (3) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR_L del Dominio VL del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(4) el Dominio VH del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

10 (5) el Dominio VL del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(6) los Dominios VH y VL del mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(F) (1) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(2) las tres CDR_H del Dominio VL del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(3) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR_L del Dominio VL del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

20 (4) el Dominio VH del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(5) el Dominio VL del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo

anti-LAG-3;

(6) los Dominios VH y VL del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(G) (1) las tres CDR_H del Dominio VL del VL4 de mAb
5 1 de hLAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(2) las tres CDR_H del Dominio VH del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3 y las tres CDR del Dominio VL del anticuerpo VL4 de mAb 1 de hLAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

o

10 que une, o compite por la unión con, el epítipo que une inmuno-específicamente mAb 1 de LAG 3, mAb 2 de LAG 3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3 o mAb 6 de LAG-3.

A. El mAb1 de LAG-3 del anticuerpo Anti-LAG-3

15 1. El mAb 1 de LAG-3 del Anticuerpo antihumano de Murino

[0075] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 1 de LAG-3 (SEQ ID NO:2) se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

20 QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS

CDR_H1 mAb 1 de LAG 3 (SEQ ID NO:4): YTFRNYGMN

CDR_H2 mAb 1 de LAG 3 (SEQ ID NO:5): **WINTYTGESTYADDFEG**

CDR_H3 mAb 1 de LAG 3 (SEQ ID NO:6): **ESLYDYYSMDY**

[0076] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 1 de LAG-3 es **SEQ ID NO:3** (los nucleótidos que
5 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac
agtcaagatc tcctgcaagg cttctgggta taccttcaga aactatggaa
tgaactgggt gaagcaggct ccaggaaagg ttttaaagtg gatgggcttgg
ataaacacct acactggaga gtcaacatat gctgatgact tcgaggggcg
10 gtttgccttc tctttgggaa cctctgccag cactgcctat ttgcagatca
acatcctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagaatcc
ctctatgatt actattctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac
cgtctcctca

[0077] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 1
15 de LAG-3 (**SEQ ID NO:7**) se muestra a continuación (los
residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLH HSDGKTYLNW LLQRPQSP
RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHTFP
YTFGGGTKLE IK

20 CDR_L1 mAb 1 de LAG 3 (**SEQ ID NO:13**): **KSSQSLHSDGKTYLN**

CDR_L2 mAb 1 de LAG 3 (**SEQ ID NO:14**): **LVSELD**

CDR_L3 mAb 1 de LAG 3 (**SEQ ID NO:15**): **WQGTHTFPYT**

[0078] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio

VL de mAb 1 de LAG-3 es **SEQ ID NO:8** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatgttgttg tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca
 accagcctcc atctcttgca a agtcaagtca gagcctctta catagtgatg
 5 gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccagag
 cgcctaattct atctgggtgtc tgaactggac tctggagtcc ctgacaggtt
 cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg
 aggctgagga tttgggagtt tattattgtc t ggcaaggta acattttccg
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

10

2. Humanización del mAb 1 de LAG-3 del anticuerpo anti LAG-3 anti-humano para Formar "mAb 1 de hLAG-3"

[0079] El mAb 1 de LAG-3 del Anticuerpo anti LAG-3 de
 15 murino descrito en lo anterior se humanizó con el fin de demostrar la capacidad para humanizar un anticuerpo anti-LAG-3 para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo dos Dominios VH humanizados, designados en la presente como "**VH-1 de mAb 1 de**
 20 **hLAG-3**", y "**VH-2 de mAb 1 de hLAG-3**", y dos Dominios VL humanizados designados en la presente como "**VL-1 de mAb 1 de hLAG-3**", y "**VL-2 de mAb 1 de hLAG-3**". Cualquiera de los Dominios VL humanizados puede aparearse con cualquiera de los

Dominios VH humanizados. Por consiguiente, cualquier anticuerpo que comprende uno de los Dominios VL humanizados apareado con el Dominio VH humanizado que se conoce genéricamente como **"mAb 1 de hLAG-3"**, y las combinaciones
 5 particulares de los Dominios VH/VL humanizados se denominan, por referencia, como los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, un anticuerpo humanizado que comprende VH-1 de mAb 1 de hLAG-3 y VL-2 de mAb 1 de hLAG-3 se denomina específicamente como **"mAb 1 (1.2) de hLAG-3."**

10 **[0080]** La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de **VH-1 de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:92)** se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASG**YTFT NYGMN**WVRQA PGQGLEWMG**W**

INTYTGESTY **ADDFEG**RFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYYCARE**S**

15 **LYDYYSMDY**W GQGTTVTVSS

[0081] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VH-1 de mAb 1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:93** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgccctc

20 cgtgaaagtg tcctgtaagg catctggg**ta tacgttcaca aattatgqta**

tgaactgggt gcgacaggca ccagggcagg gactggaatg gatgggg**tgg**

atcaatactt atacaggcga gagtacttat gctgacgatt tcgagggcag

atttgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat ctccagatta

gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt attattgtgc ccgcgagagt
ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac
 agtgagttcc

[0082] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de **VH-2**
 5 **de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:94)** se muestra a continuación
 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

10 [0083] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VH-2 de mAb**
1 de hLAG-3 es **SEQ ID NO:95** (los nucleótidos que codifican los
 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgccctc
 cgtgaaagtg tcctgtaagg catctgggta tacgttcaca aattatgqta
 15 tgaactgggt gcgacaggca ccagggcagg gactggaatg gatggggtgg
atcaatactt atacaggcga gagtacttat gctgacgatt tcgagggcag
 atttgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat ctccagatta
 gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt atttctgtgc ccgcgagagt
ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac
 20 agtgagttcc

[0084] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-1**
de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:96) se muestra a continuación
 (los residuos CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

[0085] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-1 de mAb**
 5 **1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:97** (los nucleótidos que codifican
 los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcgтта tgactcagac accactgtca ctgagtgtga cccaggtca
 gcccgctagt atttcctgта aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
 gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca aagtccagag
 10 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgтт ggcagggtac ccacttcct
 tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

[0086] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-2**
 15 **de mAb 1 de hLAG-3** (**SEQ ID NO:98**) se muestra a continuación
 (los residuos CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

20 [0087] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-2 de mAb**
1 de hLAG-3 es **SEQ ID NO:99** (los nucleótidos que codifican
 los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcgтта tgactcagac accactgtca ctgagtgtga cccaggtca

gcccgctagt atttctgtga aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactggtttctctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcaggggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 5 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttcct
tatacattttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

[0088] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-3 de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:100)** se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

10 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTFP
YTFGGGKVE IK

[0089] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-3 de mAb 1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:25** (los nucleótidos que codifican
 15 los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcgтта tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccagggtca
 gcccgctagt atttctgtga aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactggtttctctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 20 ctcaggggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttcct
tatacattttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

[0090] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-4**

de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:102) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE

RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP

5 YTFGGGTKVE IK

[0091] Un polinucleótido ejemplar que codifica VL-4 de mAb 1 de hLAG-3 es SEQ ID NO:27 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcggtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccagggtca

10 gcccgctagt atttcctgta a aatcatccca gtccctcctg catagcgatg

caaagaccta tttgaactggtttctctgcaga aaccaggcca accgccagag

agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt

ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg

aggccgagga cgtcgggggtt tactactgt t ggcagggtac ccacttcct

15 tatacattttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

[0092] Las CDR_{L1} del Dominio VL de VL-4 de mAb 1 de hLAG-3 comprende una sustitución de aminoácidos de glicina a alanina y tiene la secuencia de aminoácidos: KSSQSLLHSDAKTYLN (SEQ ID NO:104), la alanina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que una sustitución similar puede incorporarse en cualquiera de los Dominios CDR_{L1} de mAb 1 de LAG-3 descritos en lo anterior.

B. El mAb 2 de LAG-3 de anticuerpo Anti-LAG-3 anti-humano

[0093] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 2 de LAG-3 (SEQ ID NO:12) se muestra a continuación (los
5 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWLRQS HGESLEWIGY
IYPYSGDIGY NQKFKNRATL TVDNSSSTAY MDLRSLTSED SAVFYCARWH
RNYFGPWFAY WGQGTPVTVS A

CDR_H1 mAb 2 de LAG 3 (SEQ ID NO:14): YTFTDYNIH

10 CDR_H2 VH de mAb 2 de LAG-3 (SEQ ID NO:15):

YIYPYSGDIGYNQKFKN

CDR_H3 VH de mAb 2 de LAG-3 (SEQ ID NO:16): WHRNYFGPWFAY

[0094] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 2 de LAG-3 es SEQ ID NO:13 (los nucleótidos que
15 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaagatt tcctgcaaga cttctggata cacatttact gactacaaca
tacacttggtt gaggcagagc catggagaga gccttgagtg gattggatat
atttatacctt acagtgggtga tattggatac aaccagaagt tcaagaacag
20 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct ttactgtgc aagatggcac
aggaactact ttggccctg gtttgcttac tggggccaag ggactccggt
cactgtctct gca

[0095] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 2 de LAG-3 (**SEQ ID NO:17**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGESYMNWY QQKPGQPPKL
 5 LIYVVSNNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL
 TFGAGTKLEL K

CDR_L1 mAb 2 de LAG 3 (**SEQ ID NO:19**): KASQSVDYDGESYMN

CDR_L2 mAb 2 de LAG 3 (**SEQ ID NO:20**): VVSNNLES

CDR_L3 mAb 2 de LAG 3 (**SEQ ID NO:21**): QQSSEDPLT

10 **[0096]** Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 2 de LAG-3 es **SEQ ID NO:18** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgca a aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
 15 aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatTTatg ttgtatccaa tctagaatctgggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

20

C. El mAb 3 de LAG-3 del anticuerpo Anti-LAG-3 anti-humano

[0097] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 3

de LAG-3 (**SEQ ID NO:52**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVRLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGY**TFT DYNIH**WVRQS HGQSLEWIGY
IYPYNGDTGY NQKFKTKATL TVDNSSNTAY MELRSLASED SAVYYCTR**WS**
 5 **RNYFGPWFAY** WGQGTILVTVS A

CDR_H1 mAb 3 de LAG 3 (**SEQ ID NO:54**): **TFTDYNIH**

CDR_H2 mAb 3 de LAG 3 (**SEQ ID NO:55**): **YIYPYNGDTGYNQKFKT**

CDR_H3 mAb 3 de LAG 3 (**SEQ ID NO:56**): **WSRNYFGPWFAY**

[0098] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio
 10 VH de mAb 3 de LAG-3 es **SEQ ID NO:53** (los nucleótidos que
 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccggc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagata tcctgcaagg cttctgga**ta cacattcact gactacaaca**
ttcactgggt gaggcagagc catggacaga gccttgagtg gattgga**tat**
 15 **atttatacctt ataatggtga tactggctac aaccagaagt tcaagacc**aa
 ggccacattg actgtagaca attcctccaa cacagcctac atggaactcc
 gcagcctggc atctgaagac tctgcagtct attactgtac aaga**tggagc**
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
 cactgtctct gca

20 [0099] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 3
 de LAG-3 (**SEQ ID NO:57**) se muestra a continuación (los
 residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPTS LAVSLGQRAT IS**CASQSVD YDGDSYMN**WY QQKPGQPPKL

LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL

TFGAGTKLEL K

CDR_L1 mAb 3 de LAG 3 (SEQ ID NO:59): KASQSVDDYDGDSYMN

CDR_L2 mAb 3 de LAG 3 (SEQ ID NO:60): AASNLES

5 CDR_L3 mAb 3 de LAG 3 (SEQ ID NO:61): QQSSEDPLT

[00100] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 3 de LAG-3 es SEQ ID NO:58 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gacattgtgc tgaccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca
 10 gagggccacc atctcctgca a aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
atagttatat gaactggtat caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgt cagc aaagtagtga ggatccgctc
 15 acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

D. El mAb 4 de LAG-3 del anticuerpo Anti-LAG-3 anti-humano

[00101] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 4
 20 de LAG-3 (SEQ ID NO:62) se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVQLHQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYNGDAGY NQNFKTATL TVDNSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARWN

MNYFGPWFAY WGQGTILVTVS A

CDR_H1 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:64): **YTFTDYNIH**

CDR_H2 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:65): **YIYPYNGDAGYNQNFKT**

CDR_H3 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:66): **WNMNYFGPWFAY**

5 **[00102]** Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 4 de LAG-4 es **SEQ ID NO:63** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc ttcaccagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagata tcctgcaaga cttctgga**ta cactttcact gactacaaca**
 10 **tacact**gggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattgga**tat**
atttatacctt acaatggtga tgctggctac aaccagaact tcaagaccaa
 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aaga**tggaac**
atgaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
 15 cactgtctct gcg

[00103] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 4 de LAG-3 (**SEQ ID NO:67**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**KASQSVD YDGVTYIN**WY QQKPGQPPKL
 20 LIF**AASNLES** GIPARFSGSG SGTDFTLNIIH PVEEEDAATY YC**QQSNE**DPL
TFGAGTKLEL K

CDR_L1 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:69): **KASQSVDYDGVTYIN**

CDR_L2 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:70): **AASNLES**

CDR_L3 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:71): **QQSNEDPLT**

[00104] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 4 de LAG-3 es **SEQ ID NO:68** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

5 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgca a aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
 ttacttatat caactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctttt g ctgcatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 10 aggaggatgc tgcaacctat tactgt cagc aaagtaatga ggatccgctc
 acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

E. El mAb 5 de LAG-3 del anticuerpo Anti-LAG-3 anti-humano

15 **[00105]** La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 5 de LAG-3 (SEQ ID NO:72) se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

 EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNHWVKQS PGKSLEWIGY
 IYPYSGDFGY NQKFSKATL TVDNSSSTAY MDLRSLTSED SAVFYCARWH
 20 RNYFGPWFAY WGQGTILVTVS A

CDR_H1 mAb 5 de LAG 3 (SEQ ID NO:74): **YTFTDYN**

CDR_H2 mAb 5 de LAG 3 (SEQ ID NO:75): **YIYPYSGDFGYNQKF**

CDR_H3 mAb 5 de LAG 3 (SEQ ID NO:76): **WHRNYFGPW**

[00106] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 5 de LAG-3 es **SEQ ID NO:73** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 5 agtgaagatt tcctgcaaag cttctggata cacatttact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc cctggaaaga gccttgaatg gattggatat
atttatacctt acagtgggtga ttttggtac aaccagaagt tcaagagcaa
 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct ttactgtgc aagatggcac
 10 aggaactact ttggccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
 cactgtctct gca

[00107] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 5 de LAG-3 (**SEQ ID NO:77**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

15 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGESYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYVVSNNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL
TFGAGTKLEL K

CDR_L1 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:79**): **KASQSVDYDGESYMN**

CDR_L2 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:80**): **VVSNNLES**

20 CDR_L3 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:81**): **QQSSEDPLT**

[00108] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 5 de LAG-3 es **SEQ ID NO:78** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgc a aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatTTatg ttgtttccaa tctagaatctgggatcccag ccaggttttag
 5 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgt cagc aaagtagtga ggatccgctc
acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

F. El mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo Anti-LAG-3 anti-
 10 **humano**

[00109] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 6
 de LAG-3 (**SEQ ID NO:82**) se muestra a continuación (los
 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD
 15 INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

CDR_H1 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:84**): **YTFTDYNMD**

CDR_H2 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:72**): **DINPDNGVTIYNQKFEG**

CDR_H3 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:72**): **EADYFYFDY**

20 **[00110]** Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio
 VH de mAb 6 de LAG-3 es **SEQ ID NO:70** (los nucleótidos que
 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc

agtgaagata ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
tggactgggt gaagcagagc catggagaga gccttgagtg gattggagat
attaatcctg acaatggtgt tactatctac aaccagaagt ttgagggcaa
 ggccacactg actgtagaca agtcctccag tacagcctac atggagctcc
 5 gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagagggc
gattacttct actttgacta ctgggggcaa ggcaccactc tcacagtctc
 ctca

[00111] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 6
 de LAG-3 (**SEQ ID NO:87**) se muestra a continuación (los
 10 residuos de CDR se muestran subrayados):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQQKP GQSPKLLIFS
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

CDR_L1 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:89**): **KASQDVSSVVA**
 15 CDR_L2 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:90**): **SASYRYT**
 CDR_L3 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:91**): **HYSTPWT**

[00112] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio
 VL de mAb 6 de LAG-3 es **SEQ ID NO:88** (los nucleótidos que
 codifican los CDRs se muestran subrayados):

20 gacattgtga tgaccagtc tcacagattc atgtccacat cagttggaga
 cagggtcagc atcacctgca a aggccagtca ggatgtgagt tctgtttag
cctggtatca acagaaacca ggacaatctc ctaaattact gattttttcg
gcacctacc ggtacactgg agtcctgat cgcttcactg gcagtggatc

tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct gcagacctgg
 cagtttatta ctgt cagcaa cattatagta ctccgtggac gtttcggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

5 **[00113]** Se contemplan cambios menores a la secuencia de
 aminoácidos de los Dominios VH y/o VL proporcionados en la
 presente. Por ejemplo, el residuo de aminoácidos de C-
 terminal de cualquiera de los Dominios de VH y/o VL descritos
 en la presente pueden sustituirse para facilitar la
 10 subclonación.

V. **mAb 1 de LAG-3 de Anticuerpos Anti-LAG-3 anti-humano,**
mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de
LAG-3, y/o mAb 6 de LAG-3 y Sus Derivados Que Tienen una
 15 **Región de Fc Diseñada**

[00114] En la función inmune tradicional, la interacción de
 complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmune
 resulta en una amplia disposición de respuestas, que oscilan
 20 desde las funciones efectoras tales como la citotoxicidad
 dependiente de anticuerpo, la desgranulación de los
 mastocitos, y fagocitosis a las señales inmunomoduladoras
 tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y

la secreción del anticuerpo. Todas estas interacciones se inician a través de la unión de la Región de Fc de los anticuerpos o complejos inmunes a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La

5 diversidad de respuestas celulares accionadas por anticuerpos y complejos inmunes resulta de la heterogeneidad estructural de los tres receptores de Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD16) son receptores de activación (*es decir*, mejora del

10 sistema inmune); FcγRIIB (CD32B) es un receptor de inhibición (*es decir*, disminución del sistema inmune). Además, la interacción con Receptor Fc neonatal (FcRn) media el reciclaje de moléculas IgG desde el endosoma a la superficie celular y la libera en la sangre. La secuencia de aminoácidos

15 del IgG1 ejemplar (**SEQ ID NO:22**), IgG2 (**SEQ ID NO:23**), IgG3 (**SEQ ID NO: 27**), e IgG4 (**SEQ ID NO:24**) se presentan en lo anterior.

[00115] La modificación de la Región de Fc por lo regular lleva a un fenotipo alterado, por ejemplo, vida media

20 alterada del suero, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada. Puede desearse modificar un anticuerpo u otra molécula de unión de la presente invención con respecto a la función

efectora, por ejemplo, para mejorar la efectividad de tal molécula en el tratamiento de cáncer. La reducción o eliminación de la función efectora se desea en ciertos casos, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyos mecanismos de acción involucran el bloqueo o el antagonismo, pero no la exterminación de las células que soportan un antígeno objeto. La función efectora incrementada por lo general se desea cuando se dirige a células no deseadas, tales como células tumorales o extrañas, donde los FcγR se expresan en bajos niveles, por ejemplo, células B de tumor específico con bajos niveles de FcγRIIB (*por ejemplo*, linfoma no Hodgkin, CLL, y linfoma de Burkitt). En tales modalidades, las moléculas de la invención con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una eficacia mejorada de la actividad de la función efectora.

[00116] En ciertas modalidades, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc que posee una o más modificaciones (*por ejemplo*, sustituciones, eliminaciones, o inserciones) a la secuencia de aminoácidos de una Región de Fc de tipo silvestre (*por ejemplo*, **SEQ ID NO:1**), las cuales reducen la afinidad y avidez de la Región de Fc y, de este modo, la molécula de la

invención, para uno o más receptores de FcγR. En otras modalidades, las moléculas de la invención comprenden una Región de Fc que posee una o más modificaciones a los aminoácidos de la Región de Fc de tipo silvestre, lo que
5 incrementa la afinidad y la avidéz de la Región de Fc y, de este modo, la molécula de la invención, para uno o más receptores de FcγR. En otras modalidades, las moléculas comprenden una Región de Fc variante en donde tal variante confiere o media la actividad de la citotoxicidad mediada por
10 células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o una unión incrementada a FcγRIIA, en relación con una molécula que no comprende la Región de Fc o que comprende una Región de Fc de tipo silvestre. En modalidades alternativas, las moléculas comprenden una Región de Fc variante en donde tal variante
15 confiere o media la actividad de ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión incrementada a FcγRIIB, en relación con una molécula que no comprende la Región de Fc o que comprende una Región de Fc de tipo silvestre. En algunas modalidades, la invención abarca moléculas de unión a LAG-3
20 que comprenden una Región de Fc variante, la Región de Fc variante no muestra una unión detectable a cualquier FcγR, en relación con una molécula comparable que comprende la Región de Fc de tipo silvestre. En otras modalidades, la invención

abarca moléculas de unión a LAG-3 que comprenden una Región de Fc variante, la Región de Fc variante sólo se une a un solo FcγR, de preferencia uno de FcγRIIA, FcγRIIB, o FcγRIIIA. Cualquier afinidad o avidez incrementada se evalúa de preferencia al medir *in vitro* el grado de la unión detectable al FcγR o la actividad relacionada con el FcγR en las células que expresa bajos niveles del FcγR cuando la actividad de unión de la molécula original (sin la Región de Fc modificada) no puede detectarse en las células, o en células que no expresan antígenos objeto de receptor de FcγR en una densidad de 30,000 a 20,000 moléculas/células, en una densidad de 20,000 a 10,000 moléculas/células, en una densidad de 10,000 a 5,000 moléculas/células, en una densidad de 5,000 a 1,000 moléculas/células, en una densidad de 1,000 a 200 moléculas/células o en una densidad de 200 moléculas/células o menor (pero al menos 10, 50, 100 o 150 moléculas/células).

[00117] Las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención pueden comprender una Región de Fc variante que tiene afinidades alteradas para un receptor de Fcγ de activación y/o inhibición. En una modalidad, la molécula de unión de LAG-3 comprende una Región de Fc variante que tiene afinidad incrementada para FcγRIIB y afinidad disminuida para

FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una Región de Fc de tipo silvestre. En otra modalidad, la molécula de unión de LAG-3 de la presente invención comprende una Región de Fc variante, que tiene afinidad disminuida para FcγRIIB y afinidad incrementada para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una Región de Fc de tipo silvestre. En aún otra modalidad, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante que tiene afinidad disminuida para FcγRIIB y afinidad disminuida para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una Región de Fc de tipo silvestre. En aún otra modalidad, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante, que tiene una afinidad sin cambiar para FcγRIIB y afinidad disminuida (o incrementada) para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una Región de Fc de tipo silvestre.

[00118] En ciertas modalidades, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante que tiene una afinidad alterada para FcγRIIIA y/o FcγRIIA de modo que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada. Los ejemplos no limitantes de las funciones de la célula efectora incluyen citotoxicidad

mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión de C1q, y citotoxicidad mediada por células dependiente de
5 complementos.

[00119] En una modalidad preferida, la alteración en la afinidad o en la función efectora es al menos 2 veces, de preferencia al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces,
10 al menos 10 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una Región de Fc de tipo silvestre. En otras modalidades de la invención, la Región de Fc variante une inmunoespecíficamente uno o más FcRs con al menos 65%, de preferencia al menos 70%,
15 al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 125%, al menos 150%, al menos 175%, al menos 200%, al menos 225%, o al menos 250% de afinidad mayor en relación con una molécula que comprende una Región de Fc de tipo silvestre. Tales medidas pueden ser en
20 ensayos in vivo o in vitro, y en una modalidad preferida son ensayos in vitro tales como ELISA o ensayos de resonancia de plasmón superficial.

[00120] En diferentes modalidades, las moléculas de unión a

LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante en donde tal variante agoniza al menos una actividad de un receptor de FcγR, o antagoniza al menos una actividad de un receptor de FcγR. En una modalidad preferida, las

5 moléculas comprenden una variante que antagoniza una o más actividades de FcγRIIB, por ejemplo, señalización mediada por receptor de células B, activación de células B, proliferación de células B, producción de anticuerpos, afluencia de calcio intracelular de células B, progreso de ciclo celular,

10 inhibición mediada por FcγRIIB de señalización de FcεRI, fosforilación de FcγRIIB, incorporación de SHIP, fosforilación de SHIP y asociación con Shc, o actividad de una o más moléculas que se forman posteriormente (*por ejemplo*, cinasa MAP, JNK, p38, o Akt) en la trayectoria de

15 transducción de señal de FcγRIIB. En otra modalidad, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una variante que agoniza una o más actividades de FcεRI, por ejemplo, activación de mastocitos, movilización de calcio, desgranulación, producción de citocina, o liberación

20 de serotonina.

[00121] En ciertas modalidades, las moléculas comprenden una Región de Fc que comprende regiones de dos o más isotipos de IgG (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Como se utiliza

en la presente, se dice que una Región de Fc es de un isotipo de IgG particular si su secuencia de aminoácidos es más homóloga a ese isotipo en relación con otros isotipos de IgG. Los diversos isotipos de IgG muestran propiedades físicas y funcionales diferentes que incluyen vida media del suero, fijación de complemento, afinidades de unión de FcγR y actividades de función efectora (*por ejemplo*, ADCC, CDC, *etc.*) debido a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus Regiones bisagra y/o Fc, por ejemplo, como se describe en Flesch y Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; o Brüggemann *et al.* (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Este tipo de Región de Fc variante puede utilizarse solo, o en combinación con una modificación de aminoácidos, para afectar la función mediada por Fc y/o actividad de unión. En combinación, la modificación de aminoácidos y la Región bisagra/Fc de IgG puede mostrar funcionalidad similar (*por ejemplo*, afinidad incrementada para FcγRIIA) y puede actuar de forma aditiva o, de más preferencia, de forma sinérgica para modificar la funcionalidad efectora en la molécula de la invención, en relación con una molécula de la invención que comprende una

Región de Fc de tipo silvestre. En otras modalidades, la modificación de aminoácidos y la Región de Fc de IgG pueden mostrar funcionalidad opuesta (*por ejemplo*, afinidad incrementada y disminuida para FcγRIIA, respectivamente) y puede actuar para moderar o reducir selectivamente una funcionalidad específica en la molécula de la invención, en relación con una molécula de la invención que no comprende una Región de Fc o que comprende una Región de Fc de tipo silvestre del mismo isotipo.

10 **[00122]** En una modalidad preferida específica, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante, en donde tal Región de Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una Región de Fc de tipo silvestre, de modo que

15 tal molécula tiene una afinidad alterada para un FcR, siempre que tal Región de Fc variante no tenga una sustitución en posiciones que hacen un contacto directo con FcγR con base en el análisis cristalográfico y estructural de interacciones de Fc-FcR tales como aquellas descritas por Sonderrmann *et al.*

20 (2000) Nature 406:267-73. Los ejemplos de posiciones dentro de la Región de Fc que hacen contacto directo con FcγR son residuos de aminoácidos 234-239 (región bisagra), residuos de aminoácidos 265-269 (bucle B/C), residuos de aminoácidos 297-

299 (bucle C'/E), y residuos de aminoácidos 327-332 (bucle F/G). En algunas modalidades, las moléculas de la invención comprenden Regiones de Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que no hace un contacto
5 directo con un FcγR con base en el análisis estructural y cristalográfico, *por ejemplo*, no se encuentra dentro del sitio de unión de Fc-FcγR.

[00123] Las Regiones de Fc variantes son bien conocidas en la técnica, y cualquier Región de Fc variante conocida puede
10 utilizarse en la presente invención para conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de la invención que comprende una Región de Fc (o porción de la misma) como se ensayó de manera funcional, *por ejemplo*, en un ensayo dependiente de NK o un ensayo dependiente de macrófagos. Por
15 *ejemplo*, las variantes de la Región de Fc identificadas como que alteran la función efectora se describen en las publicaciones de PCT No. WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; y WO 2008/140603, y cualquier variante adecuada descrita en las
20 mismas puede utilizarse en las moléculas presentes.

[00124] En ciertas modalidades, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos

en una o más regiones, estas modificaciones alteran (en relación con una Región de Fc de tipo silvestre) la **Relación de Afinidades** de la Región de Fc variante a un FcγR de activación (tal como FcγRIIA o FcγRIIIA) en relación con un

5 FcγR de inhibición (tal como FcγRIIB):

	Tipo Natural a Cambio de Variante en
Relación de Afinidades	Afinidad en FcγR _{Activación}

	Tipo Natural a Cambio de Variante en
	Afinidad en FcγR _{Inhibición}

[00125] Particularmente, se prefieren moléculas de unión a

10 LAG-3 de la presente invención que posean una Región de Fc variante (en relación con la Región de Fc de tipo silvestre) en las que la Región de Fc variante tiene una Relación de Afinidades mayor que 1. Tales moléculas tienen uso particular al proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de

15 una enfermedad, un trastorno, o una infección, o la mejora de un síntoma del mismo, donde se desea una eficiencia mejorada de la función celular efectora (*por ejemplo*, ADCC) mediada por FcγR, *por ejemplo*, cáncer o enfermedad infecciosa. En contraste, una Región de Fc variante que tiene una Relación

20 de Afinidades menor que 1 media la eficiencia disminuida de la función celular efectora. **Tabla 1** listas de mutaciones sencillas, dobles, triples, cuádruples, quintuples por su Relación de Afinidades ya sea mayor o menor que 1.

Tabla 1 Mutaciones Sencillas y Múltiples Ejemplares Listadas por Relación de Afinidades				
Senci lla	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
Relación de Afinidades > 1				
F243L	F243L & R292P	F243L, P247L & N421K	L234F, F243L, R292P & Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L
D270E	F243L & Y300L	F243L, R292P & Y300L	L235I, F243L, R292P & Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L
R292G	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I	L235Q, F243L, R292P & Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L R292P & Y300L R292P	F243L, R292P & P396L F243L, Y300L & P396L P247L, D270E	F243L, P247L, D270E & N421K F243L, R255L, D270E & P396L F243L, D270E,	

Tabla 1 Mutaciones Sencillas y Múltiples Ejemplares Listadas por Relación de Afinidades				
Senci lla	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
	& V305I R292P & P396L Y300L & P396L P396L & Q419H	& N421K R255L, D270E & P396L D270E, G316D & R416G D270E, K392T & P396L D270E, P396L & Q419H V284M, R292L & K370N R292P, Y300L & P396L	G316D & R416G F243L, D270E, K392T & P396L F243L, D270E, P396L & Q419H F243L, R292P, Y300L, & P396L F243L, R292P, V305I & P396L P247L, D270E, Y300L & N421K R255L, D270E, R292G & P396L	

Tabla 1 Mutaciones Sencillas y Múltiples Ejemplares Listadas por Relación de Afinidades				
Senci lla	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
			R255L, D270E, Y300L & P396L D270E, G316D, P396L & R416G	
Relación de Afinidades < 1				
Y300L P396L	F243L & P396L P247L & N421K R255L & P396L R292P & V305I	F243L, R292P & V305I		

Tabla 1 Mutaciones Sencillas y Múltiples Ejemplares Listadas por Relación de Afinidades				
Senci lla	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
	K392T & P396L P396L & Q419H			

[00126] En una modalidad específica, en Regiones de Fc
 variantes, cualquier modificación de aminoácidos (*por*
ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 235,
 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328, o 330 y de
 5 preferencia uno o más de los siguientes residuos: A240, I240,
 L241, L243, H244, N298, I328 o V330. En una modalidad
 específica diferente, en Regiones de Fc variantes, cualquier
 modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, sustituciones) en
 cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278,
 10 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331,
 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430,
 434, 435, 437, 438 o 439 y de preferencia uno o más de los

siguientes residuos: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 o L300.

[00127] En una modalidad preferida, en Regiones de Fc variantes que unen un FcγR con una afinidad alterada, cualquier modificación de aminoácidos (*por ejemplo,* sustituciones) en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. De preferencia, la Región de Fc variante tiene cualquiera de los siguientes residuos: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 o A430.

[00128] En una modalidad diferente, en Regiones de Fc variantes que unen un FcγR (mediante su Región de Fc) con una afinidad reducida, cualquier modificación de aminoácidos (*por ejemplo,* sustituciones) en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o

439.

[00129] En una modalidad diferente, en Regiones de Fc variantes que unen un FcγR (mediante su Región de Fc) con una afinidad mejorada, cualquier modificación de aminoácidos (*por*
5 *ejemplo*, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430. En una modalidad diferente, en Regiones de Fc variantes que unen FcγRIIA con una afinidad mejorada, cualquiera de los
10 siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 o A430.

[00130] Las variantes preferidas incluyen una o más
15 modificaciones en cualquiera de las posiciones: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 o 332.

20 **[00131]** Las variantes particularmente preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas a partir de grupos A-AI:

A	228E, 228K, 228Y o 228G;
B	230A, 230E, 230Y o 230G;
C	231E, 231K, 231Y, 231P o 231G;
D	232E, 232K, 232Y, 232G;
E	233D;
F	234I o 234F;
G	235D, 235Q, 235P, 235I o 235V;
H	239D, 239E, 239N o 239Q;
I	240A, 240I, 240M o 240T;
J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H o 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G, 247V o 247L;
N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E o 262F;
O	263A, 263I, 263M o 263T;
P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T o 264W;
Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N o 265Q;
R	266A, 266I, 266M o 266T;
S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W o 271G;

T	273I;
U	275L o 275W;
V	281D, 281K, 281Y o 281P;
W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y or284M;
X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I o 291G;
Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W o 299Y;
Z	302I;
AA	304D, 304N, 304T, 304H o 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;
AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W o 325P;
AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M o 328N;
AG	330L, 330Y, 330I o 330V;
AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P,

	332G o 332Y; y
AI	336E, 336K o 336Y

[00132] Las variantes aún más particularmente preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas a partir de Grupos 1-105:

Grupo	Variante	Grupo	Variante
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N

9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N

20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I 332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D

37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D /	104	Y296Q / N297I / I332E

	I332E		
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

[00133] En una modalidad, una molécula de unión de LAG-3 de la invención comprenderá una Región de Fc variante que tiene al menos una modificación en la Región de Fc. En ciertas modalidades, la Región de Fc variante comprende al menos una
5 sustitución seleccionada a partir del grupo que consiste de L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I, y P396L, en donde tal numeración es aquella del índice de UE de acuerdo con Kabat.

[00134] En una modalidad específica, la Región Fc variante comprende:

10 (A) al menos una sustitución seleccionada a partir del grupo que consiste de F243L, R292P, Y300L, V305I, y P396L;

(B) al menos dos sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de:

15 (1) F243L y P396L;

(2) F243L y R292P; y

(3) R292P y V305I;

(C) al menos tres sustituciones seleccionadas a partir

del grupo que consiste de:

- (1) F243L, R292P y Y300L;
- (2) F243L, R292P y V305I;
- (3) F243L, R292P y P396L; y
- 5 (4) R292P, V305I y P396L;

(D) al menos cuatro sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de:

- (1) F243L, R292P, Y300L y P396L; y
- (2) F243L, R292P, V305I y P396L; o

10 (E) al menos las cinco sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de:

- (1) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L; y
- (2) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L.

[00135] En otra modalidad específica, la Región de Fc
15 variante comprende sustituciones de:

- (A) F243L, R292P, y Y300L;
- (B) L235V, F243L, R292P, Y300L, y P396L; o
- (C) F243L, R292P, Y300L, V305I, y P396L.

[00136] En otras modalidades, la invención abarca el uso de
20 cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tal como aquellas descritas en Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fcγ₁R: Current Models", Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002)

"Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function",
Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001)
"Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit
Complement", J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al.
5 *(2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human*
IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn
And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc
gamma R", J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al.
(2000) "Mapping Of The Clq Binding Site On Rituxan, A
10 *Chimeric Antibody With A Human IgG Fc", J. Immunol. 164:4178-*
84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-
Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal
Antibody To Human CD4", J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et
al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3
15 *Effector Function Variant Antibodies", Cell. Immunol. 200:16-*
26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG
Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte
Triggering Activities", Eur. J. Immunol. 29:2613-24;
Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And
20 *Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide*
Interactions", Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al.
(1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core
Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And

Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains", J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; 5 Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation", Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc 10 Gamma Receptors", FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo", Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma 15 R11", Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG", J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG", Nature 20 332:563-564; Patente de los Estados Unidos Números 5,624,821; 5,885,573; 6,194,551; 7,276,586; y 7,317,091; y Publicaciones PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

[00137] En algunas modalidades, las moléculas de la

invención además comprenden uno o más sitios de glicosilación, de modo que una o más fracciones de carbohidrato se unen de forma covalente a la molécula. De preferencia, las moléculas de la invención con uno o más
5 sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la Región de Fc confieren o tienen una función efectora mediada por anticuerpos mejorada, *por ejemplo*, actividad de ADCC, en comparación con el anticuerpo sin modificar. En algunas modalidades, la invención además comprende moléculas que
10 comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que son directa o indirectamente conocidos para interactuar con una fracción de carbohidrato de la Región de Fc, que incluye pero no se limita a aminoácidos en posiciones 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, o 301. Los
15 aminoácidos que interactúan directa o indirectamente con una fracción de carbohidrato de una Región de Fc se conocen en la técnica, véase, *por ejemplo*, Jefferis *et al.*, 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7, el cual se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

20 **[00138]** En otra modalidad, la invención abarca moléculas que se modificaron al introducir uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de las moléculas, de preferencia sin alterar la funcionalidad de las moléculas,

por ejemplo, actividad de unión al antígeno objeto o Fc $\square$. Los sitios de glicosilación pueden introducirse en la región variable y/o constante de las moléculas de la invención. Como se utiliza en la presente, "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia específica de aminoácidos en un anticuerpo a la que un oligosacárido (*es decir*, carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos juntos) se unirán de forma específica y covalente. Las cadenas laterales de oligosacárido se unen típicamente a una estructura base de un anticuerpo ya sea mediante conectores N u O. La glicosilación unida a N se refiere a la fijación de una fracción de oligosacárido en la cadena lateral de un residuo de aspargina. La glicosilación unida a O se refiere a la fijación de una fracción de oligosacárido a un ácido hidroxiamino, *por ejemplo*, serina, treonina. Las moléculas de la invención pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, que incluyen sitios de glicosilación unidos a N y unidos a O. Cualquier sitio de glicosilación unido a N o unido a O conocido en la técnica puede utilizarse de acuerdo con la invención actual. Un sitio de glicosilación unido a N ejemplar que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invención es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en donde X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser

que indica una treonina o una serina. Tal sitio o sitios pueden introducirse en una molécula de la invención utilizando métodos bien conocidos en la técnica a los cuales pertenece esta invención (véase por ejemplo, *IN VITRO* Mutagenesis, Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, 5 *et al.* W.H. Freeman and Company, New York, 1983, capítulo 8, pp. 106-116, la cual se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. Un método ejemplar para introducir un sitio de glicosilación en una molécula de la 10 invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácido de la molécula de modo que se obtiene la secuencia Asn-X-Thr/Ser.

[00139] En algunas modalidades, la invención abarca métodos para modificar el contenido de carbohidrato de una molécula 15 de la invención al agregar o eliminar el sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidrato de los anticuerpos (y moléculas que comprenden dominios de anticuerpo, *por ejemplo*, Región de Fc) se conocen bien en la técnica y se abarcan dentro de la invención, 20 *véase, por ejemplo*, Patente de los Estados Unidos No. 6,218,149; EP 0 359 096 B1; Publicación de los Estados Unidos No. US 2002/0028486; WO 03/035835; Publicación de los Estados Unidos No. 2003/0115614; Patente de los Estados Unidos No.

6,218,149; Patente de los Estados Unidos No. 6,472,511; todas las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad. En otras modalidades, la invención abarca métodos para modificar el contenido de carbohidrato de una molécula de la invención al eliminar una o más fracciones de carbohidrato endógeno de la molécula. En una modalidad específica, la invención abarca el cambio del sitio de glicosilación de la Región de Fc de un anticuerpo, al modificar las posiciones adyacentes a 297. En una modalidad específica, la invención abarca modificar la posición 296 de modo que la posición 296 y ninguna posición 297 se glicosila.

[00140] La función efectora también puede modificarse por las técnicas tales como introducir uno o más residuos de cisteína en la Región Fc, por lo que permite que se produzca la formación de unión de disulfuro de intercadena en esta región, resultando en la generación de un anticuerpo homodimérico que puede tener capacidad de internalización mejorada y/o exterminio de célula mediada por complemento incrementado y ADCC (Caron, P.C. et al. (1992) "Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies", J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) "A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity", J. Immunol. 148(9):2918-2922. Los

anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también pueden prepararse utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff, E.A. et al. (1993) "*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice*", Cancer Research 53:2560-2565. Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tiene Regiones FC duales y puede por lo tanto tener lisis de complemento mejorado y capacidades ADCC (Stevenson, G.T. et al. (1989) "*A Chimeric Antibody With Dual Regiones Fc (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge*", Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

[00141] La vida media del suero de las moléculas de la presente invención que comprende Regiones Fc puede incrementarse al incrementar la afinidad de unión de la Región Fc para FcRn. El término "vida media" como se utiliza en la presente significa una propiedad farmacocinética de una molécula que es una medida del tiempo de supervivencia medio de las moléculas seguido de su administración. La vida media puede expresarse como el tiempo requerido para eliminar el cincuenta por ciento (50%) de una cantidad de la molécula del cuerpo de un sujeto (*por ejemplo*, paciente humano u otro mamífero) o un compartimento específico del mismo, *por ejemplo*, como se mide en suero, es decir, vida media de

circulación, o en otros tejidos. En general, un incremento en la vida media resulta en un incremento tiempo medio de residencia (MRT) en circulación para la molécula administrada

[00142] En algunas modalidades, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una Región Fc en estado natural y que muestra una vida media incrementada (en relación con una Región Fc en estado natural).

[00143] En algunas modalidades, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante que comprende una sustitución de aminoácidos de extensión de vida media en una o más posiciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, según se numera por el índice de la UE de acuerdo con Kabat. Las numerosas mutaciones específicas capaces de incrementar la vida media de una molécula que contiene Región Fc se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, 252Y, 254T, 256E, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, véase, las mutaciones descritas en la Patente de los Estados Unidos Números 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797, 8,088,376;

Publicación de los Estados Unidos Números 2002/0147311;
2007/0148164; y Publicación Internacional Números WO 98/23289
y WO 2009/058492, las cuales se incorporan en la presente
para referencia en sus totalidades. Las moléculas que
5 contienen Región Fc con vida media mejorada también incluyen
aquellas sustituciones en dos o más de los residuos de Región
Fc 250, 252, 254, 256, 257, 309, 311, 428, 433, 434, (Pat. De
los E.U.A. Nos. 7,083,784 y 8,088,376).

[00144] En una modalidad específica, la Región Fc variante
10 comprende sustituciones de:

- (A) 252Y, 254T y 256E;
- (B) 250Q y 428L;
- (C) T307Q y N434A;
- (D) A378V y N434A;
- 15 (E) N434A y Y436I; o
- (F) V308P y N434A.

VI. Diacuerpos LAG-3 anti-humano

[00145] Una modalidad de la presente invención se relaciona
20 con moléculas de unión biespecíficas que son capaces de
unirse a un "**primer epítipo**" y a un "**segundo epítipo**", en
donde el primer epítipo es un epítipo de LAG-3 humano y el
segundo epítipo es el mismo o un epítipo diferente de LAG-3,

o es un epítopo de otra molécula que se encuentra presente en la superficie de una célula inmune tal como un linfocito T. El segundo epítopo es preferiblemente no un epítopo de LAG-3. En una modalidad, el segundo epítopo es un epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectina 9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA. En una modalidad específica, el segundo epítopo es CD137, PD-1, OX40, TIGIT, o TIM-3.

1. Diacuerpos Biespecíficos Que Carecen de Regiones Fc

[00146] Una modalidad de la presente invención se relaciona con diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden, y de más preferencia consisten de, una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, cuyas secuencias permiten que las cadenas de polipéptidos se unan de forma covalente entre sí para formar un complejo asociado de forma covalente que es capaz de unirse simultáneamente a LAG-3 y el segundo epítopo (por ejemplo, un epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC

clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.)

[00147] La primera cadena de polipéptidos de una modalidad de tales diacuerpos monovalentes biespecíficos comprende, en la dirección de la N-terminal a la C-terminal, un N-término, el Dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a ya sea el primer epítipo o segundo epítipo (*es decir*, ya sea VL_{LAG-3} o VL_{Epítipo 2}), un primer péptido separador de intervención (Enlazador 1), un Dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera del segundo epítipo (si tal primera cadena de polipéptidos contiene VL_{LAG-3}) o el primer epítipo (si tal primera cadena de polipéptidos contiene VL_{Epítipo 2}), un segundo péptido separador de intervención que contiene cisteína (Enlazador 2), un Dominio de Promoción de Heterodímero y un C-Término (**Figura 1**). La notación "VL1" y "VH1" indica respectivamente, el Dominio de Cadena Ligera Variable y el Dominio de Cadena Pesada Variable que une el "primer" epítipo. De manera similar, la notación "VL2" y "VH2" indica respectivamente, el Dominio de Cadena Ligera Variable y Dominio de Cadena Pesada Variable que une el "segundo" epítipo.

[00148] La segunda cadena de polipéptidos de esta modalidad de diacuerpos monovalentes biespecíficos comprende, en la dirección d N-terminal a C-terminal, un N-término, un Dominio

VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 o un Dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al segundo epítipo (es decir, ya sea VL_{LAG-3} o VL_{Epítipo 2}, y el Dominio VL no se selecciona para inclusión en la primera
5 cadena de polipéptidos del diacuerpo), un péptido enlazador de intervención (Enlazador 1), un Dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera del segundo epítipo (si tal segunda cadena de polipéptidos contiene VL_{LAG-3}) o un Dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-
10 3 (si tal segunda cadena de polipéptidos contiene VL_{Epítipo 2}), un segundo péptido separador de intervención (Enlazador 2) que contiene de forma opcional un residuo de cisteína, un Dominio de Promoción de Heterodímero, y un C-término (**Figura 1**).

15 **[00149]** El Dominio VL de la primera cadena de polipéptidos interactúa con el Dominio VH de la segunda cadena de polipéptidos para formar un primer sitio de unión al antígeno funcional que es específico para un primer antígeno (es decir, ya sea el LAG-3 o un antígeno que contiene el segundo
20 epítipo). De igual forma, el Dominio VL de la segunda cadena de polipéptidos interactúa con el Dominio VH de la primera cadena de polipéptidos para formar un segundo sitio de unión al antígeno funcional que es específico para un segundo

antígeno (*es decir*, ya sea un antígeno que contiene el segundo epítipo o LAG-3). De este modo, la selección de los Dominios VL y VH de la primera y segunda cadena de polipéptidos se coordina, de modo que las dos cadenas de polipéptidos del diacuerpo comprenden de forma colectiva Dominios VL y VH capaces de unirse tanto a un epítipo de LAG-3 y al segundo epítipo (*por ejemplo*, comprenden VL_{LAG-3}/VH_{LAG-3} y $VL_{Epítipo\ 2}/VH_{Epítipo\ 2}$)

[00150] De mayor preferencia, la longitud del péptido enlazador de intervención (*por ejemplo*, Enlazador 1 que separa tales Dominios VL y VH) se selecciona para prevenir sustancial o completamente que los Dominios VL y VH de la cadena de polipéptidos se unan entre sí. De este modo, los Dominios VL y VH de la primera cadena de polipéptidos son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. De igual forma, los Dominios VL y VH de la segunda cadena de polipéptidos son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Un péptido separador preferido de intervención (Enlazador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:33**):

GGGSGGGG.

[00151] El segundo péptido separador de intervención que contiene cisteína (Enlazador 2) contendrá 1, 2, 3 o más de 3 residuos de cisteína. Un péptido separador que contiene

cisteína preferido (Enlazador 2) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:34**): GGCGGG. Alternativamente, el Enlazador 2 no comprende un Dominio de Promoción de Heterodímero que Contiene Cisteína, como se describe a continuación. De manera
5 opcional, tanto un Enlazador 2 que contiene cisteína y un Dominio de Promoción de Heterodímero que contiene cisteína se utilizan.

[00152] Los Dominios de Promoción de Heterodímero pueden ser GVEPKSC (**SEQ ID NO:35**) o VEPKSC (**SEQ ID NO:36**) o AEPKSC (**SEQ ID NO:115**) en una cadena de polipéptidos y GFNRGEC (**SEQ ID NO:37**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:38**) en la otra cadena de polipéptidos (US2007/0004909).

[00153] De mayor preferencia, sin embargo, los Dominios de Promoción de Heterodímero de tales diacuerpos se forman a
15 partir de uno, dos, tres o cuatro dominios de hélice repetidos en tándem de carga opuesta que comprenden una secuencia de al menos seis, al menos siete o al menos ocho residuos de aminoácidos, de modo que el Dominio de Promoción de Heterodímero posee una carga neta (Apostolovic, B. et al.
20 (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil", Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a

Heterodimeric Coiled-coil Domain", J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) "Comparison of In Vivo Selection y Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils", Structure 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "Protein
5 Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions", Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon
10 Resonance Spectroscopy", J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "Real-Time Monitoring of the Interactions de Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic y Thermodynamic Constants of Binding", Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-
15 Rodriquez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag", Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In
20 Protein Structures", Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions", Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "Designing Heterodimeric

Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity", J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "The d'--d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif", J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface", J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C y the C-terminal Troponin I Regulatory Region y Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance", J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies", Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism", J. Gene Med. 10:355-367).

[00154] Tales dominios de hélice repetidos pueden ser repeticiones exactas o pueden tener sustituciones. Por ejemplo, el dominio de hélice del Dominio de Promoción de Heterodímero de la primera cadena de polipéptidos puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos

seleccionados para conferir una carga negativa a tal Dominio de Promoción de Heterodímero, y el dominio de hélice del Dominio de Promoción de Heterodímero de la segunda cadena de polipéptidos puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos seleccionados para conferir una carga positiva a tal Dominio de Promoción de Heterodímero. Es irrelevante que la hélice se proporcione a la primera o segunda cadena de polipéptido, siempre que, cuando las dos cadenas se proporcionen con tales Dominios de Promoción de Heterodímero, se utiliza una carga opuesta para la otra cadena de polipéptidos. Los aminoácidos cargados positivamente pueden ser lisina, arginina, histidina, etc. y/o el ácido cargado negativamente puede ser ácido glutámico, ácido aspártico, etc. El aminoácido cargado positivamente de preferencia es lisina y/o el aminoácido cargado negativamente de preferencia es ácido glutámico. Es posible que se emplee sólo un Dominio de Promoción de Heterodímero (puesto que tal dominio inhibirá la homodimerización y por consiguiente promoverá la heterodimerización), sin embargo, se prefiere que tanto la primera y la segunda cadena de polipéptidos de los diacuerpos de la presente invención contengan Dominios de Promoción de Heterodímero.

[00155] En una modalidad preferida, uno de los Dominios de

Promoción de Heterodímero comprenderá cuatro dominios helicoidales de hélice "E-hélice" en tándem (**SEQ ID NO:39: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**), cuyos residuos de glutamato formarán una carga negativa en pH 7, mientras que los demás

5 Dominios de Promoción de Heterodímero comprenderán cuatro dominios helicoidales "K-hélice" en tándem (**SEQ ID NO:40: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK**), cuyos residuos de lisina formarán una carga positiva en pH 7. La presencia de tales dominios cargados promueve la asociación entre el primer y el

10 segundo polipéptido, y de este modo fomenta la formación de heterodímero. Especialmente, se prefiere un Dominio de Promoción de Heterodímero en el que uno de los cuatro dominios "E-hélice" en tándem de **SEQ ID NO:39** se modificó para contener un residuo de cisteína: **EVAAÇEK-EVAALEK-**

15 **EVAALEK-EVAALEK** (**SEQ ID NO:41**). De igual forma, se prefiere un Dominio de Promoción de Heterodímero en el que uno de los cuatro dominios "K-hélice" en tándem de **SEQ ID NO:40** se modificó para contener un residuo de cisteína: **KVAAÇE-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK** (**SEQ ID NO:42**).

20 **[00156]** Como se describe en WO 2012/018687, con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de diacuerpos, un diacuerpo puede modificarse para contener una porción de polipéptido de una proteína de unión al suero en

una o más de las terminales del diacuerpo. De mayor preferencia, tal porción de polipéptido de una proteína de unión al suero se instalará en el C-término del diacuerpo. La albúmina es la proteína más abundante y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee varios sitios de unión a molécula pequeña que le permiten unirse de forma no covalente a otras proteínas y extender, por consiguiente, su vida media del suero. El Dominio de Unión a Albumina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococo* consiste de 46 residuos de aminoácidos que forman un haz de tres hélices estable y tiene una especificidad de unión a albumina amplio (Johansson, M.U. et al. (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. De este modo, una porción de polipéptido particularmente preferida de una proteína de unión al suero para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de un diacuerpo es el Dominio de Unión a Albúmina (ABD) de la proteína G de *estreptococo*, y de más preferencia, el Dominio de Unión de Albúmina 3 (ABD3) de proteína G de la cepa G148 de *Streptococo* (**SEQ ID NO:43**): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

[00157] Como se describe en WO 2012/162068 (incorporada en la presente para referencia), las variantes "**desinmunizadas**"

de **SEQ ID NO:43** tienen la capacidad para atenuar o eliminar la unión de MHC clase II. Con base en los resultados de mutación combinacional, las siguientes combinaciones de sustituciones se considerarán sustituciones preferidas para formar tales dominios de ABD desinmunizada: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Las variantes de las ADB que tienen las modificaciones L64A, I65A y D79A o las modificaciones N66S, T70S y D79A. La ABD desinmunizada variante que tiene la secuencia de aminoácido:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP
(**SEQ ID NO:116**),

O la secuencia de aminoácidos:

15 LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIAA₇₉E ILAALP
(**SEQ ID NO:44**),

O la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIAA₇₉E ILAALP
(**SEQ ID NO:45**),

20 se prefieren, particularmente, como tal ABD desinmunizada que muestra unión sustancialmente en estado natural mientras que proporciona unión de MHC clase II atenuada. De este modo, la primera cadena de polipéptidos de tal diacuerpo que tiene una

ABD contiene un tercer enlazador (Enlazador 3) de preferencia colocado de manera C-terminal en el Dominio de E-hélice (o K-hélice) de tal cadena de polipéptidos para intervenir entre el Dominio de E-hélice (o K-hélice) y la ABD (que de preferencia es una ABD desinmunizada). Una secuencia preferida para tal Conector 3 es **SEQ ID NO:46**: GGGs.

2. Diacuerpos Biespecíficos que Contienen

Regiones Fc

10 **[00158]** Una modalidad de la presente invención se relaciona con diacuerpos biespecíficos que comprenden una Región Fc capaz de unirse simultáneamente a LAG-3 y un segundo epítipo (*por ejemplo* B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, 15 TIM-3, *etc.*). La adición de un Dominio CH2-CH3 de IgG a una o ambas cadenas de polipéptidos de diacuerpo, de modo que la complejidad de las cadenas de diacuerpo resulta en la formación de una Región Fc, incrementa la vida media biológica y/o altera la valencia del diacuerpo. La 20 incorporación de un dominio CH2-CH3 de IgG en ambos polipéptidos de diacuerpo permitirá que se forme un diacuerpo que contiene la Región Fc biespecífico de dos cadenas (**Figura 2**).

[00159] Alternativamente, la incorporación de un Dominio CH2-CH3 de IgG en uno solo de los polipéptidos de diacuerpo permitirá que se forme un diacuerpo que contiene la Región Fc biespecífico de cuatro cadenas más complejo (**Figuras 3A-3C**).
5 La **Figura 3C** muestra un diacuerpo de cuatro cadenas representativo que posee el Dominio Ligero Constante (CL) y el Dominio Pesado Constante CH1, sin embargo, los fragmentos de tales dominios al igual que otros polipéptidos pueden emplearse alternativamente (véase, por ejemplo, las **Figuras**
10 **3A y 3B**, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos No. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). De este modo, por ejemplo, en
15 lugar del Dominio CH1, se puede emplear un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GVEPKSC (**SEQ ID NO:35**) VEPKSC (**SEQ ID NO:36**), o AEPKSC (**SEQ ID NO:115**), derivada del dominio bisagra de un IgG humano, y en lugar del Dominio CL, se puede emplear los 6 aminoácidos de C-terminal aminoácidos
20 de la cadena ligera kappa, GFNRGEC (**SEQ ID NO:37**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:38**). Un péptido representativo que contiene el diacuerpo de cuatro cadenas se muestra en la **Figura 3A**. Alternativamente, o además, se puede emplear un péptido que

comprende dominios de hélice en tándem de carga opuesta tales como los dominios helicoidales "E-hélice" (SEQ ID NO:39: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK o SEQ ID NO:103: EVAAÇEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); y los dominios "K-hélice" (SEQ ID NO:102: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE o SEQ ID NO:40: KVAAÇKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Un dominio helicoidal representativo que contiene el diacuerpo de cuatro cadenas se muestra en la **Figura 3B**.

[00160] Los enlazadores adicionales o alternativos que pueden emplearse en los diacuerpos de diacuerpo que contienen Región Fc de la presente invención incluyen: ASTKG (SEQ ID NO:47), DKHTCTPPCP (SEQ ID NO:48), LEPKSS (SEQ ID NO:30), APSSS (SEQ ID NO:49), y APSSSPME (SEQ ID NO:31), LEPKSADKHTCTPPC (SEQ ID NO:50), GGC, y GGG. SEQ ID NO:49 puede utilizarse en lugar de GGG o GGC para facilidad de clonación. Adicionalmente, los aminoácidos GGG, o SEQ ID NO:49 pueden seguirse inmediatamente por SEQ ID NO:47 para formar los enlazadores alternativos: GGGDKHTCTPPCP (SEQ ID NO:112); y LEPKSSDKHTCTPPCP; (SEQ ID NO:51).

[00161] Como se proporciona en la Figura 3A-3C, los diacuerpos de la invención pueden comprender cuatro cadenas diferentes. La primera y tercera cadena de polipéptidos de tal diacuerpo contienen tres dominios: (i) un Dominio que

contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2, (iii) Dominio de Promoción de Heterodímero y (iv) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda y cuarta cadena de polipéptidos contienen: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio de Promoción de Heterodímero, donde los Dominios de Promoción de Heterodímero promueven la dimerización de la primera/tercera cadena de polipéptidos con la segunda/cuarta cadena de polipéptidos. Los Dominios VL y/o VH de la tercera y cuarta cadena de polipéptidos, y los Dominios VL y/o VH de la primera y segunda cadena de polipéptidos pueden ser los mismos o diferentes para permitir la unión tetravalente que es tanto monoespecífica, biespecífica o tetraespecífica. La estructura general de las cadenas de polipéptidos de los diacuerpos que contienen Región Fc de cuatro cadenas representativos de la invención se proporciona en la **Tabla 2**:

Tabla 2		
Biespecífico	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Tetraespecífico	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH

	1 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4 ^a Cadena	NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH

[00162] En una modalidad específica, los diacuerpos de la presente invención son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes (*es decir*, poseen cuatro sitios de unión a epítopo) (**Figura 3**), que se componen de cuatro

5 cadenas de polipéptidos totales. Los diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes, de la invención comprenden dos sitios de unión a epítopo inmuno-específicos para LAG-3, y dos sitios de unión a epítopo específicos para un segundo epítopo (*por ejemplo*, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86,

10 CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, *etc.*).

[00163] En una modalidad adicional, los diacuerpos que contienen Región Fc biespecíficos pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer polipéptido de tal

15 diacuerpo contiene tres dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. El segundo polipéptido de tal diacuerpo contiene: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio que promueve la

20 heterodimerización y unión covalente con la primera cadena de

polipéptidos del diacuerpo. El tercer polipéptido de tales diacuerpos comprende una secuencia CH₂-CH₃. De este modo, la primera y segunda cadena de polipéptidos de tales diacuerpos se asocian juntos para formar un sitio de unión a VL1/VH1 que es capaz de unirse al primer epítipo, así como un sitio de unión a VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítipo. El primer y segundo polipéptido se unen entre sí a través de un enlace disulfuro que involucra residuos de cisteína en sus Terceros Dominios respectivos. En particular, la primera y tercera cadena de polipéptidos forman complejos entre sí para formar una Región de Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Tales diacuerpos tienen potencia mejorada. Las **Figuras 4A y 4B** ilustran las estructuras de tales diacuerpos. Tales diacuerpos que contienen Región Fc biespecíficos pueden tener cualquiera de dos orientaciones (**Tabla 3**):

Tabla 3		
Primera Orientación	3 ^a Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Segunda Orientación	3 ^a Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD-

		COOH
	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH

[00164] La Región Fc de los diacuerpos que contienen diacuerpos de la presente invención pueden ser una Región Fc completa (*por ejemplo*, una Región Fc completa de IgG) o solo un fragmento de una Región Fc. De manera opcional, la Región Fc de los diacuerpos que contienen Región Fc de la presente invención carece del residuo de aminoácidos de lisina de C-terminal. En particular, la Región Fc de los diacuerpos que contienen Región Fc de la presente invención puede ser una Región Fc variante diseñada. Aunque la Región Fc de los diacuerpos que contienen Región Fc biespecíficas de la presente invención puede poseer la capacidad de unirse a uno o más receptores Fc (*por ejemplo*, FcγR(s)), de más preferencia tal Región Fc variante tendrá unión alterada a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por una Región Fc en estado natural) o tendrá capacidad sustancialmente reducida o no tendrá capacidad de unirse a receptores inhibidores. De este modo, la Región Fc de los diacuerpos que contienen Región Fc de la presente invención puede incluir algunos o todos los Dominios CH2 y/o algunos o todos los Dominios CH3 de una Región Fc completa, o puede

comprender una secuencia CH2 variante y/o una secuencia CH3 variante (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más eliminaciones con respecto a los dominios CH2 o CH3 de una Región Fc completa). Tales Regiones Fc pueden comprender porciones de polipéptido no Fc, o pueden comprender porciones de Regiones Fc completas de forma no natural, o pueden comprender orientaciones que ocurren de forma no natural de Dominios CH2 y/o CH3 (tales como, por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3, o en la dirección N-terminal a C-terminal, un Dominio CH3 enlazado a un Dominio CH2, etc.).

[00165] Las modificaciones de la Región Fc identificadas como función efectora de alteración se conocen en la técnica, incluyendo modificaciones que incrementan la unión a receptores de activación (por ejemplo, FcγRIIA (CD16A) y reducen la unión a receptores inhibidores (por ejemplo, FcγRIIB (CD32B) (véase, por ejemplo, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγgamma Receptors*", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Las variantes ejemplares de las Regiones Fc de IgG1 de humano con unión reducida a CD32B y/o unión incrementada a CD16A contienen

sustituciones de F243L, R292P, Y300L, V305I o P296L. Estas sustituciones de aminoácidos pueden presentarse en una Región Fc de IgG1 de humano en cualquier combinación o subcombinación. En una modalidad, la Región Fc variante de
5 IgG1 de humano contiene una sustitución de F243L, R292P y Y300L. En una modalidad, la Región Fc variante de IgG1 de humano contiene sustituciones de F243L, R292P, Y300L, V305I y P296L.

[00166] En particular, se prefiere que los Dominios CH2-CH3
10 de las cadenas de polipéptidos de los diacuerpos que contienen Región Fc de la presente invención muestren unión disminuida (o sustancialmente sin ella) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la Región Fc
15 de IgG1 en estado natural (**SEQ ID NO:1**)). Las Regiones Fc variantes y las formas mutantes capaces de mediar tal unión alterada se describen en lo anterior. En una modalidad específica, los Dominios de CH2-CH3 de cadenas de polipéptido de la Región Fc contiene diacuerpos de la presente invención
20 que comprenden una Región IgG que exhibe una función de efecto reducido ADCC. En una modalidad preferida el Dominio CH2-CH3 de la primer y/o tercera cadenas de polipéptidos de tales moléculas incluye cualquiera de 1, 2, o 3, de las

sustituciones: L234A, L235A, N297Q, y N297G. En otra modalidad, la Región Fc variante de IgG de humano contiene una sustitución de N297Q, una sustitución de N297G, sustituciones de L234A y L235A o una sustitución de D265A, ya
5 que estas mutaciones erradican la unión a FcR. Alternativamente, se utiliza un Dominio CH2-CH3 de una Región Fc que muestra de forma inherente unión disminuida (o sustancialmente sin ella) a FcγRIIIA (CD16a) y/o una función efectora reducida (en relación con la unión mostrada por la
10 Región Fc de IgG1 en estado natural (SEQ ID NO:1)). En una modalidad específica, los diacuerpos que contienen Región Fc de la presente invención comprenden una Región Fc de IgG2 (SEQ ID NO:23) o una Región Fc de IgG4 (SEQ ID:NO:24). Cuando se utiliza una Región de Fc de IgG4, la invención también
15 acompaña la introducción de una mutación estabilizante, tal como S228P, como ens numerada por el índice de la UE y se establece en Kabat (Lu et al., (2008) "The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation", J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969)
20 para reducir la incidencia de intercambio de trenzados. Otras mutaciones de estabilización conocidas en la técnica pueden introducirse en una Región de Fc de IgG4 (Peters, P et al., (2012) "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced

Disulfide Bond Heterogeneity y Increased Fab Domain Thermal Stability", J. Biol. Chem., 287:24525-24533; Publicación de Patente PCT No: WO 2008/145142).). Puesto que las sustituciones de N297G, N297Q, L234A, L235A y D265A suprime
5 la función efectora, en circunstancias en la cuales se desea una función efectora, sería preferible que no se emplearan estas sustituciones.

[00167] Los Dominios de CH2 y/o CH3 de tales cadenas de polipéptidos no necesitan ser idénticas en secuencia, y se
10 modifican ventajosamente para fomentar la complejación entre las dos cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (de preferencia una sustitución con un aminoácidos que comprende un grupo lateral voluminoso que forma una "protuberancia", *por ejemplo*, triptófano) puede
15 introducirse en el Dominio de CH2 o CH3 de tal manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio similarmente mutado y obligará al dominio mutado a formar un par con un dominio en el cual una mutación complementaria o de adaptación, *es decir*, "el agujero" (*por ejemplo*, una
20 sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprenden los Dominios CH2-CH3 que forman una Región de Fc. Los métodos de diseño de proteína para favorecer la

heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto al diseño de moléculas similares a inmunoglobulina, y se abarcan en la presente (véase por ejemplo, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-
5 Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35, y Xie et al. (2005) "A New Format Of
10 Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Métodos 296:95-101; cada uno de los cuales por consiguiente se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). De preferencia la "protuberancia" se diseña en los Dominios CH2-CH3 de la
15 primera cadena de polipéptidos y el "agujero" se diseña en los Dominios CH2-CH3 de la tercera cadena de polipéptidos de diacuerpos que comprenden tres cadenas de polipéptidos. De esta manera, la "protuberancia" ayudará a evitar que la primera cadena de polipéptidos se homodimericen mediante sus
20 Dominios de CH2 y/o CH3. Cuando la tercera cadena de polipéptidos de preferencia contiene la sustitución de "agujero", se someterá a heterodimerización con la primera cadena de polipéptidos así como también se someterá a

homodimerizacion con sí misma. Una estrategia similar puede ser utilizada por diacuerpos que comprenden cuatro cadenas donde la "protuberancia" está diseñada en los Dominios CH2-CH3 de la segunda cadena de polipéptidos y el "agujero" está
5 diseñado en los Dominios CH2-CH3 de la cuarta cadena de polipéptidos.

[00168] Una protuberancia preferida se crea al modificar una Región de Fc de IgG para contener la modificación de T366W. Un agujero preferido se crea al modificar una Región de Fc de
10 IgG para contener la modificación de T366S, L368A y Y407V. Para ayudar a purificar el tercer homodímero de cadena de polipéptidos que porta el agujero desde la molécula que contiene la Región de Fc heterodimérica biespecífica final, el sitio de unión de la proteína A de los Dominios de CH2 y
15 CH3 de la tercera cadena de polipéptidos se muta de preferencia por sustitución de aminoácidos en la posición 435 (H435R). De esta manera, el tercer homodímero de cadena de polipéptidos que porta el agujero no se unirá a la proteína A, mientras el heterodímero biespecífico retendrá su
20 capacidad para unir la proteína A mediante el sitio de unión de la proteína A en la primera cadena de polipéptidos.

[00169] Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los Dominios CH2 y CH3 de la primera cadena de polipéptidos

de un diacuerpo que contiene la Región de Fc de la presente invención tendrá la secuencia **"que porta la protuberancia"**

(SEQ ID NO:25):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 5 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

[00170] Una secuencia preferida para los Dominios CH2 y CH3
 10 de la segunda cadena de polipéptidos de un diacuerpo que
 contiene la Región de Fc de la presente invención que tiene
 dos cadenas de polipéptidos (o la tercera cadena de
 polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc que
 tiene tres, cuatro, o cinco cadenas de polipéptido) tendrá la
 15 secuencia **"que porta el agujero"** (SEQ ID NO:26):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 20 ALHNRYTQKS LSLSPGX

[00171] Como se observará, los Dominios CH2-CH3 de la **SEQ ID NO:25** y la **SEQ ID NO:26** incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina, y de esta manera

forma una Región de Fc muestra una unión disminuida (o sustancialmente sin) unión a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la región Fc de tipo
5 silvestre (**SEQ ID NO:1**)).

[00172] Se prefiere que la primera cadena de polipéptidos tendrá a una secuencia de CH2-CH3 "que porta la protuberancia", tal como aquella de la **SEQ ID NO:25**. Sin embargo, se reconocerá, un Dominio CH2-CH3 "que porta el
10 agujero" (*por ejemplo*, **SEQ ID NO:26**) podría emplearse en la primera cadena de polipéptidos, en cuyo caso, un Dominio CH2-CH3 "que porta la protuberancia" (*por ejemplo*, **SEQ ID NO:25**) puede emplearse en la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc de la presente
15 invención que tiene dos cadenas de polipéptidos (o la tercera cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc que tiene tres, cuatro, o cinco cadenas de polipéptido).

20 VII. Anticuerpos de Referencia

A. Anticuerpo Anti-LAG-3 de Referencia

[00173] Con el fin de evaluar y caracterizar las moléculas de unión anti-LAG-3 anti-humano novedosas de la presente

invención, se empleó el siguiente anticuerpo de referencia:
25F7 (BMS-986016, Medarex/BMS, designada en la presente como
 "mAb A de LAG-3").

1. **25F7 ("mAb A de LAG-3")**

5 [00174] La secuencia de aminoácidos del Domino VH de **25F7**
 ("mAb A de LAG-3") (SEQ ID NO:99) se muestra en lo siguiente
 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNTNSN PSLKSRVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS

10 DYEYNWFDPW GQGT_LLVTVSS

[00175] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de
25F7 ("LAG-3 mAb A") (SEQ ID NO:58) se muestra en lo
 siguiente (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 15 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ

GTNLEIK

B. **Anticuerpos Anti-PD-1 de Referencia**

[00176] Con el fin de evaluar y caracterizar la actividad de
 las moléculas de unión de LAG-3 anti-humano novedosas de la
 presente invención en combinación con un anticuerpo anti-PD-1
 20 puede utilizarse un anticuerpo de referencia. Se conocen
 anticuerpos que son inmuno-específicos para PD-1 (véase, por
 ejemplo, Patentes de los Estados Unidos No. 8,008,449;

8,552,154; Publicaciones de Patente PCT WO 2012/135408; WO 2012/145549; y WO 2013/014668) e incluye: nivolumab (también conocida como 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106) y comercializada como OPDIVO® por Bristol-Myers Squibb) designada en la presente como **"mAb 1 de PD-1;"** pembrolizumab (anteriormente conocida como lambrolizumab, también conocida como MK-3475, SCH-900475, y comercializada como KEYTRUDA® por Merck) designada en la presente como **"mAb 2 de PD-1;"** EH12.2H7 (Dana Farber) designada en la presente como **"mAb 3 de PD-1;"** pidilizumab (también conocida como CT-011, CureTech,) designada en la presente como **"mAb 4 de PD-1"**.

1. Nivolumab ("mAb 1 de PD-1")

[00177] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:108**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVESGGG VVQPGRSRLR DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV

IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND

20 DYWGQGTLLV VSS

[00178] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 1 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:109**) (los residuos de CDR_L se muestran

subrayados) :

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

5

2. Pembrolizumab ("mAb 2 de PD-1")

[00179] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 2 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:133**) (los residuos de CDR_H se muestran

10 subrayados) :

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

[00180] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 2 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:111**) (los residuos de CDR_L se muestran

15

subrayados) :

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QOKPGQAPRL
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
 20 TFGGGTKVEIK

3. EH12.2H7 ("mAb 3 de PD-1")

[00181] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de

Cadena Pesada de **mAb 3 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:112**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
 5 IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRWR
DSSGYHAMDY WGQGTSVTVSS

[00182] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 3 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:113**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL
 LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGTKLEI K

15 4. Pidilizumab ("mAb 4 de PD-1")

[00183] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 4 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:114**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

20 QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMYFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

[00184] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de

Cadena Ligera de **mAb 4 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:9**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
 5 SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSIQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
 TKLEIK

VIII. Métodos de Producción

[00185] Un polipéptido anti-LAG-3, y otros agonistas, antagonistas y moduladores de LAG-3 pueden crearse a partir
 10 de los polinucleótidos y/o secuencias de los anticuerpos de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante.
 15 Un método para producir tales agonistas antagonistas y moduladores implican síntesis química del polipéptido, seguido por tratamiento bajo condiciones de oxidización apropiadas para obtener la conformación nativa, es decir, los ligamentos de unión de disulfuro. Esto puede lograrse
 20 utilizando metodologías bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica (véase, por ejemplo, Kelley, R. F. et al. (1990) En: Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19;

Stewart, J.M et al. (1984) Síntesis de Péptido de Fase Sólida, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; véase también en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; y 3,862,925).

5 **[00186]** Los polipéptidos de la invención pueden prepararse convenientemente utilizando síntesis de péptido de fase sólida (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers
10 Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

15 **[00187]** En aún otra alternativa, los anticuerpos completamente humanos que tienen uno o más de los CDR de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 o los cuales compiten con mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-
20 3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 para unirse al LAG-3 humano o una forma soluble del mismo puede obtenerse a través del uso de ratones comercialmente disponibles que se han diseñado para expresar las proteínas de inmunoglobulina

humana específica. Los animales transgénicos que se designas para producir una respuesta inmune más deseable (*por ejemplo*, los anticuerpos completamente humanos) o más sólida también puede utilizarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ (ambos de Medarex, Inc., Princeton, NJ).

[00188] En una alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse recombinantemente y expresarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos pueden elaborarse recombinantemente al aislar primero los anticuerpos elaborados a partir de animales huésped, obteniendo la secuencia del gen, y utilizando la secuencia del gen para expresar el anticuerpo recombinantemente en las células huésped (*por ejemplo*, células CHO). Otro método que puede emplearse e para expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (*por ejemplo*, tabaco) o leche transgénica. Los métodos adecuados para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche se han descrito (véase, *por ejemplo*, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", Int. Rev. Immunol 13:65-93; y Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As

A Method For The Production Of Recombinant Antibodies", J. Immunol Los métodos 231:147-157). Los métodos adecuados para hacer derivados de anticuerpos, *por ejemplo*, humanizados, de cadena simple, *etc.* se conocen en la técnica. En otra
5 alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse recombinantemente por tecnología de despliegue de fago (véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; y Winter, G. *et al.* (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*",
10 Annu. Rev. Immunol. 12.433-455).

[00189] Los anticuerpos o proteínas de interés pueden someterse a secuenciación por degradación de Edman, se conoce bien por aquellos con experiencia en la técnica. La información de polipéptido generada a partir de
15 espectrometría de masa o degradación de Edman pueden utilizarse para diseñar las ondas o cebadores que se utilizan para clonar la proteína de interés.

[00190] Un método alternativo para clonar la proteína de interés es por "toma panorámica" utilizando LAG-3 purificado
20 o porciones del mismo para células que expresan un anticuerpo o proteína de interés que posee una o más de los CDR de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 o que se completan con mAb 1 de

LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 para unirse al LAG-3 humano. El procedimiento de "toma panorámica" puede conducirse al obtener la biblioteca de ADNc de tejidos o células que expresan el LAG-3, que sobreexpresan los ADNc en un segundo tipo de células, y seleccionar las células transfectadas del segundo tipo de células para una unión específica a LAG-3 en la presencia o ausencia de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3. Descripciones detalladas de los métodos utilizados en genes de mamífero de clonación se codifica para la proteína de superficie celular por "toma panorámica" pueden encontrarse en la técnica (véase, por ejemplo, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 y Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation", Endocrinol. 140:5841-5854).

[00191] Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un número de medios apropiados, incluyendo electroporación, cloruro de calcio que emplea transfección,

cloruro de rubidio, fosfato de calcio, dextrano de DEAE, u
otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección;
e infección (*por ejemplo*, donde el vector es un agente de
infección tal como virus vaccinia). La elección de introducir
5 vectores o polinucleótidos dependerá con frecuencia de las
características de las células huésped.

[00192] Cualquier célula huésped es capaz de sobreexpresar
los ADN heterólogos puede utilizarse para el propósito de
aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o
10 proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células
huésped de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a
células COS, HeLa, y CHO. De preferencia, las células huésped
que expresan los ADNc en un nivel de aproximadamente 5 veces
más, de mayor preferencia 10 veces más, incluso de mayor
15 preferencia 20 veces más que aquellos del anticuerpo o
proteína de interés endógena correspondiente, si está
presente, en las células huésped. Seleccionar las células
huésped para una unión específica para LAG-3 se efectúa de
preferencia por un inmunoensayo o FACS. Una célula que
20 sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés puede
identificar.

[00193] La invención incluye polipéptidos que comprenden una
secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de esta

invención. Los polipéptidos de esta invención pueden elaborarse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, por métodos recombinantes (*es decir,*
5 polipéptidos simples o de fusión) como se describe en lo anterior o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se elaboran convenientemente por síntesis química. Los métodos de síntesis química se
10 conocen en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles. Por ejemplo, un polipéptido anti-LAG-3 podría producirse por un sintetizador de polipéptido automatizado que emplea el método de fase sólida.

[00194] La invención incluye variantes de anticuerpos de mAb
15 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 y sus fragmentos de polipéptido que se unen a LAG-3, que incluyen anticuerpos funcionalmente equivalentes y polipéptidos de fusión que no afectan significativamente las propiedades de tales moléculas
20 así como también variantes que tienen actividad mejorada o disminuida. La modificación de polipéptidos es de rutina práctica en la técnica y no necesita describirse en detalle en la presente. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen

polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de forma perjudicial la actividad funcional, o uso de análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse moderadamente entre sí incluyen pero no se limitan a: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos también incluyen polipéptidos glicosilados y no-glicosilados, así como también polipéptidos con otras modificaciones post-translacionales, tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación, y fosforilación. De preferencia, las sustituciones de aminoácidos pueden conservarse, es decir, los aminoácidos sustituidos pueden poseer propiedades químicas similares como aquellas de los aminoácidos originales. Tales sustituciones conservadoras se conocen en la técnica, y los ejemplos se han proporcionado en lo anterior. Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, tal como el Dominio Variable. Los cambios en el Dominio Variable pueden alterar la afinidad de unión y/o especificidad. Otros métodos de

modificación incluyen utilizar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución y quelación oxidativa. Las modificaciones pueden utilizarse, por ejemplo, para la

5 conexión de etiquetas para inmunoensayo, tal como la conexión de porciones radioactivas para radioinmunoensayo. Los polipéptidos modificados se hacen utilizando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica.

10 **[00195]** La invención abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más de los polipéptidos o anticuerpos mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 de esta invención. En una modalidad, se proporciona un polipéptido de fusión que

15 comprende una cadena ligera, una cadena pesada o ambas de una cadena ligera y pesada. En otra modalidad, el polipéptido de fusión contiene una región constante de inmunoglobulina heteróloga. En otra modalidad, el polipéptido de fusión contiene un Dominio Variable de Cadena Ligera y un Dominio

20 Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado públicamente. Para propósitos de esta invención, una proteína de fusión de anticuerpo contiene uno o más dominios de polipéptido que se unen específicamente

a LAG-3 y otra secuencia de aminoácidos la cual no se conectan en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga a partir de otra región.

5 **IX. Usos de las Moléculas de Unión a LAG-3 de la Presente**

Invención

[00196] La presente invención abarca composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención (por
10 *ejemplo*, anticuerpos anti-LAG-3, diacuerpos biespecíficos anti-LAG-3, *etc.*), los polipéptidos derivados de tales moléculas, los polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican tales moléculas o polipéptidos, y otros agentes como se describe en la presente.

15 [00197] Como se discute en lo anterior, LAG-3 juega un papel importante en regular negativamente la proliferación, función y homeostasis de células T. Las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención tienen la capacidad de inhibir la función de LAG-3, y de esta manera invierten la inhibición
20 del sistema inmune mediado por LAG-3. Como tal, mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, y mAb 6 de LAG-3, sus derivados humanizados, y moléculas que comprenden sus fragmentos de unión de LAG-3

(*por ejemplo*, diacuerpos biespecíficos, etc.), o que compiten para unirse con tales anticuerpos, pueden utilizarse para bloquear la inhibición del sistema inmune mediado por LAG-3, y promueve por consiguiente la activación del sistema inmune.

5 **[00198]** Las moléculas de unión a LAG-3 biespecíficas de la presente invención que se unen a LAG-3 y otras moléculas implicadas en regular un punto de control presente en la superficie celular (*por ejemplo*, PD-1) aumenta el sistema inmune al bloquear la inhibición del sistema inmune mediada
10 por LAG-3 y tales moléculas del punto de control inmune. De esta manera, las moléculas de unión a LAG-3 de la invención son útiles para aumentar una respuesta inmune (*por ejemplo*, la respuesta inmune mediada por células T) de un sujeto. En particular, las moléculas de unión a LAG-3 de la invención
15 pueden utilizarse para tratar cualquier enfermedad o padecimiento asociado con un sistema inmune indeseablemente suprimido, que incluye cáncer y enfermedades que son asociadas con la presencia de un patógeno (*por ejemplo*, una infección por bacteria, hongos, virus o protozoario).

20 **[00199]** Los cánceres que pueden ser tratados por las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención incluyen cánceres caracterizados por la presencia de una célula cancerígena seleccionada del grupo que consiste de una célula

de: un tumor de la glándula adrenal, un cáncer asociado con SIDA, un sarcoma de parte blanda alveolar, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un
5 cáncer de mama, unos tumores de cuerpo carótido, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromóforo, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplástico de células
10 redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Erwing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, una fibrogenesis imperfecta ósea, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer de vesícula o de conducto biliar, cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástico gestacional, un tumor de célula
15 germinal, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, una leucemia, un tumor de lipoma/lipomatoso benigno, un tumor de liposarcoma/lipomatoso maligno, un cáncer hepático, un linfoma, un cáncer pulmonar,
20 un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplástico, un neuroblastoma, tumores neuroendócrinos, un cáncer ovárico, un cáncer pancreático, un carcinoma

papilar tiroideo, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer prostático, un melanoma uveal posterior, un raro desorden hematológico, un
5 cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer de tiroides
10 metastásico, y un cáncer uterino.

[00200] En particular, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de cáncer colorectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga,
15 neuroblastoma; sarcoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y cáncer rectal.

[00201] Los trastornos asociados con patógenos que pueden tratarse por las moléculas de unión a LAG-3 de la presente
20 invención incluyen infecciones virales crónicas, bacterianas, fúngicas y por parásitos. Las infecciones crónicas que pueden tratarse por las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención incluyen virus de Epstein Barr, Virus de Hepatitis

A (HAV); Virus de Hepatitis B (HBV); Virus de Hepatitis C (HCV); virus del herpes (por ejemplo HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), Virus de Estomatitis Vesicular (VSV), *Bacilli*, *Citrobacter*, *Cholera*,
5 *Diphtheria*, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*,
Klebsiella, *Legionella*, *Meningococci*, *mycobacteria*,
Pseudomonas, *Pneumonococci*, *rickettsia bacteria*, *Salmonella*,
Serratia, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus*
(*A. fumigatus*, *A. niger*, etc.), *Blastomyces dermatitidis*,
10 *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*,
etc.), *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (*mucor*,
absidia, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Paracoccidioides*
brasiliensis, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*,
Leptospirosis, *Borrelia burgdorferi*, parásitos helminto
15 (anquilostoma, tenias, trematodos, gusanos planos (por
ejemplo *Schistosomia*), *Giardia lamblia*, *trichinella*,
Dientamoeba Fragilis, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*,
y *Leishmania donovani*.

[00202] Las moléculas de unión a LAG-3 de la invención
20 pueden combinarse con un agente inmunogénico tal como vacuna
para tumores. Tales vacunas pueden comprender antígenos para
tumor purificado (que incluye proteínas recombinantes,
péptidos, y moléculas de carbohidrato), células tumorales

antólogas o alogénicas. Una serie de estrategias de vacuna para tumores se han descrito (véase por ejemplo, Palena, C., et al., (2006) "Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies", Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I., et al. (2011) "Cancer immunotherapy comes of age", Nature 480, 480-489; Zhang, X. M. et al. (2008) "The Anti-Tumor Immune Response Induced By A Combination of MAGE-3/MAGE-n-Derived péptidos", Oncol. Rep. 20, 245-252; Disis, M. L. et al. (2002) "Generation of células T Immunity to the HER-2/neu proteína After Active Immunization con HER-2/neu Peptide-Based Vaccines", J. Clin. Oncol. 20:2624-2632; Vermeij, R. et al. (2012) "Potentiation of a p53-SLP Vaccine By Cyclophosphamide In Ovarian Cancer: A Single-Arm Phase II Study". Int. J. Cancer 131:E670-E680). Las moléculas de unión a LAG-3 de la invención pueden combinarse con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrador (Mokyr. M.B. et al. (1998) "Realization Of The Therapeutic Potential Of CTLA-4 Blockade In Low-Dose Chemotherapy-Treated Tumor-Bearing Mice", Cancer Research 58: 5301-5304).

[00203] Las moléculas de unión a LAG-3 de la invención pueden combinarse con otras moléculas inmunoestimuladoras tales como anticuerpos que activan la respuesta inmune del

huésped para proporcionar niveles incrementados de activación de células T. en particular, los anticuerpos de anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o unos anticuerpos anti-CTLA-4 se ha demostrado que activan el sistema inmune (véase, por ejemplo, del Rio, M-L. et al. (2005) "Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation", Eur. J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. et al. (2006) "Restoring Function In Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral infection", Nature 439, 682-687; Iwai, Y. et al. (2002) "Involvement of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy by PD-L1 blockade", Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293-12297; Leach, D. R., et al., (1996) "Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade", Science 271, 1734-1736). Las moléculas inmunoestimuladoras adicionales que pueden combinarse con las moléculas de unión a LAG-3 de la invención incluyen anticuerpos para moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de células dendríticas (DC) y la presentación de antígeno, los anticuerpos anti-CD40 capaces de sustituirse por la actividad auxiliar de células T, y activar los anticuerpos en las moléculas coestimuladoras de células T tales como PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB, e ICOS (véase, por ejemplo, Ito et al.

(2000) "Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies", Immunobiology 201:527-40; U.S. Pat. No. 5,811,097; Weinberg et al. (2000) "Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity", Immunol 164:2160-2169; Melero et al. (1997) "Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors", Nature Medicine 3: 682-685; Hutloff et al. (1999) "ICOS is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related to CD28", Nature 397: 263-266; y Moran, A.E. et al. (2013) "The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy", Curr Opin Immunol. 2013 Apr; 25(2): 10.1016/J.coi.2013.01.004), y/o los Receptores de Antígeno Quimérico estimuladores (los **CAR**) que comprende un dominio de unión de antígeno dirigida contra un antígeno de enfermedad fusionado a uno o más dominios de señalización intracelular de diversos receptores de proteína coestimuladores (por ejemplo, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, etc.) que sirven para estimular las células T tras la unión de antígenos (véase, por ejemplo, Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric

Antigen Receptor", Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells", Blood 123(15):
5 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T células Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia", Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors
10 Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo", Leukemia 28(8):1596-1605).

[00204] Las moléculas de unión a LAG-3 de la invención pueden combinarse con Receptores de Antígeno Quimérico inhibidor (los **iCAR**) para aparte de la respuesta de
15 inmunoterapia objeto. Los iCAR un dominio de unión de antígeno dirigido contra un antígeno de enfermedad se fusiona a uno o más dominios de señalizaciones intracelular de diversos receptores de proteína inhibidores (por ejemplo, CTLA-4, PD-1, etc.) que sirven para limitar la respuesta de
20 células T tras la unión de antígenos (véase, por ejemplo, Fedorov V.D. (2013) "PD-1- and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses", Sci Tranl Med. 5(215):215ra172).

[00205] En particular, los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención se utilizan en combinación con un anticuerpo anti-CD137, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-TIM-3 y/o una vacuna para el cáncer.

[00206] Además de su utilidad en terapia, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención pueden etiquetarse de manera detectable y utilizarse en la detección de LAG-3 en muestras o en la captura de imágenes de LAG-3 en células.

10

X. Composiciones Farmacéuticas

[00207] Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*por ejemplo*, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas ((es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que puede utilizarse en la preparación de forma de dosificación unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención, o combinación de tales agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. De preferencia, las composiciones de la invención comprenden una cantidad

profiláctica o terapéuticamente efectiva de las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La invención abarca particularmente tales composiciones farmacéuticas en las

5 cuales las moléculas de unión a LAG-3 es: un anticuerpo mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3; un anticuerpo de mAb 1 de LAG-3; mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 humanizado; un fragmento de unión a

10 LAG-3 de cualquiera de tal anticuerpo; y en el cual la molécula de unión a LAG-3 es un diacuerpo de LAG-3 biespecífico (*por ejemplo*, un diacuerpo biespecífico de LAG-3 x PD-1). Se abarcan especialmente tales moléculas que comprenden los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 1 de LAG-3; o que

15 comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 2 de LAG-3; o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 3 de LAG-3, o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 4 de LAG-3, o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 5 de LAG-3, o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 6 de LAG-3.

20 **[00208]** La invención también abarca tales composiciones farmacéuticas que incluyen adicionalmente un segundo anticuerpo terapéutico (*por ejemplo*, anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de

cáncer particular, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[00209] En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o un estado o listado
5 en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente, o vehículo con el cual
10 se administra el compuesto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El
15 agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol, también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes
20 farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno,

glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes de humectación o emulsificantes, o agentes de regulación de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, capsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares.

[00210] Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran ya se por separado o mezcladas juntas en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como ampolla o saquito que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición se administrará por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene un grado farmacéutico estéril de agua o solución salina. Donde la composición se administra por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00211] Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a aquellas formadas con aniones tales como aquellas derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y

aquellos formados con cationes tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina procaina etc.

5 **[00212]** La invención también proporciona un paquete o equipo farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con una molécula de unión a LAG-3 de la presente invención (y de mayor preferencia, un anticuerpo de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb
10 6 de LAG-3; un anticuerpo de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de LAG-3 humanizado; un fragmento de unión a LAG-3 de cualquiera de tal anticuerpo; o en cual la molécula de unión de LAG-3 es un diacuerpo de LAG-3 biespecífico (*por ejemplo*, un diacuerpo
15 biespecífico a LAG-3 x PD-1)). Se abarcan especialmente tales moléculas que comprenden los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 1 de LAG-3; o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 2 de LAG-3; o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 3 de LAG-3; o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 4 de
20 LAG-3; o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 5 de LAG-3; o que comprende los 3 CDR_L y los 3 CDR_H de mAb 6 de LAG-3, solo o con tal portador farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, uno o más de otros agentes profilácticos o

terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o equipo farmacéutico. La invención también proporciona un paquete o equipo farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociados con tales recipientes pueden tener una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos cuya notificación refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

[00213] La presente invención proporciona equipos que pueden utilizarse en los métodos anteriores. Un equipo puede comprender cualquiera de las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención. El equipo además puede comprender uno o más de otros agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer, en uno o más recipientes; y/o el equipo además puede comprender uno o más anticuerpos citotóxicos que unen uno o más antígenos de cáncer asociados con cáncer. En ciertas modalidades, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quimioterapéutico. En otras modalidades, el agente profiláctico o terapéutico es un

agente terapéutico biológico u hormonal.

XI. Métodos de Administración

[00214] Las composiciones de la presente invención pueden
5 proporcionarse para el tratamiento, profilaxis, y mejora de
uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o
infección al administrar a un sujeto una cantidad efectiva de
una proteína de fusión o una molécula conjugada de la
invención, o una composición farmacéutica que comprende una
10 proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención.
En un aspecto preferido, tales composiciones son
sustancialmente purificadas (*es decir*, sustancialmente libres
de sustancias que limitan su efecto o producen efectos
colaterales indeseados). En una modalidad específica, el
15 sujeto es un animal, de preferencia un mamífero tal como un
no-primate (*por ejemplo*, bovino, equino, felino, canino,
roedor, *etc.*) o un primate (*por ejemplo*, mono tal como, un
mono cynomolgus, humano, *etc.*). En una modalidad preferida,
el sujeto es un humano.

20 [00215] Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden
utilizarse para administrar la composición de la invención,
por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas,
microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el

anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por el receptor (véase, *por ejemplo*, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), la
5 construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, *etc.*

[00216] Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (*por ejemplo*, intradérmica, intramuscular,
10 intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (*por ejemplo*, intranasal y rutas orales). En una modalidad específica, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención se administran intramuscular, intravenosa, o subcutáneamente. Las composiciones pueden administrarse a
15 cualquier ruta conveniente, *por ejemplo*, por infusión o inyección de bolo, mediante la absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal y mucosa intestinal, *etc.*) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos.
20 La administración puede ser sistémica o local. Además, la administración pulmonar también puede emplearse, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosol. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de

los Estados Unidos Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y las Publicaciones de PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada una de las cuales
5 se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

[00217] La invención también proporciona que las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención se empaquen en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o saquito que indica la cantidad de la molécula. En una
10 modalidad, tales moléculas se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para administración a un sujeto. De preferencia,
15 las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado.

[00218] Las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención deben almacenarse entre 2°C y 8°C en su recipiente
20 original y las moléculas deben administrarse dentro de 12 horas, de preferencia dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de una hora después de que se reconstituya. En una modalidad alternativa, tales moléculas

se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. De preferencia, tales moléculas de unión a LAG-3 cuando se
5 proporcionan en forma líquida se suministran en un recipiente herméticamente sellado.

[00219] La cantidad de la composición de la invención la cual será efectiva en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno pueden
10 determinarse por técnicas clínicas estándares. La dosis precisa a emplearse en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la seriedad del padecimiento, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y cada una de las circunstancias del paciente. La dosis efectiva puede
15 extrapolarse a través de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba in vitro o de modelo animal.

[00220] Para los anticuerpos de unión a LAG-3 abarcadas por la invención, la dosis administrada a un paciente es preferiblemente determinada en base del peso del cuerpo (kg)
20 del sujeto recipiente. La dosis de anticuerpo administrado es típicamente de al menos alrededor de 0.01 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 0.05 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 0.1 µg/kg de peso corporal, al menos

alrededor de 0.2 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 0.5 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 1 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 2 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 3 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 5 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 20 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 30 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 50 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 250 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 750 µg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 1.5 mg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 3 mg/kg de peso corporal, al menos alrededor de 5 mg/kg de peso corporal, o al menos alrededor de 10 mg/kg, al menos alrededor de 30 mg/kg, al menos alrededor de 50 mg/kg, al menos alrededor de 75 mg/kg, al menos alrededor de 100 mg/kg, al menos alrededor de 125 mg/kg, al menos alrededor de 150 mg/kg o más de peso corporal. La dosis calculada se administrará basada en el peso corporal del paciente en los valores de referencia. Un cambio significativo ($\geq 10\%$) en el peso corporal de los valores de referencia o el peso de meseta establecido debe impulsar volver a realizar el cálculo de la dosis.

[00221] Para los diacuerpos biespecíficos de unión a LAG-3 abarcadas por la invención, la dosis administrada a un paciente está típicamente de al menos alrededor de 0.3 ng/kg por día a alrededor de 0.9 ng/kg por día, de al menos
5 alrededor de 1 ng/kg por día a alrededor de 3 ng/kg por día, de al menos alrededor de 3 ng/kg por día a alrededor de 9 ng/kg por día, de al menos alrededor de 10 ng/kg por día a alrededor de 30 ng/kg por día, de al menos alrededor de 30 ng/kg por día a alrededor de 90 ng/kg por día, de al menos
10 alrededor de 100 ng/kg por día a alrededor de 300 ng/kg por día, de al menos alrededor de 200 ng/kg por día a alrededor de 600 ng/kg por día, de al menos alrededor de 300 ng/kg por día a alrededor de 900 ng/kg por día, de al menos alrededor de 400 ng/kg por día a alrededor de 800 ng/kg por día, de al
15 menos alrededor de 500 ng/kg por día a alrededor de 1000 ng/kg por día, de al menos alrededor de 600 ng/kg por día a alrededor de 1000 ng/kg por día, de al menos alrededor de 700 ng/kg por día a alrededor de 1000 ng/kg por día, de al menos alrededor de 800 ng/kg por día a alrededor de 1000 ng/kg por
20 día, de al menos alrededor de 900 ng/kg por día a alrededor de 1000 ng/kg por día, o al menos alrededor de 1,000 ng/kg por día. La dosis calculada se administrará basada en el peso corporal del paciente en los valores de referencia. Un cambio

significativo ($\geq 10\%$) en el peso corporal de los valores de referencia o el peso de meseta establecido debe impulsar volver a realizar el cálculo de la dosis.

[00222] En otra modalidad, se administra al paciente un
5 régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de tal
cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de una
molécula de unión a LAG-3 de la presente invención, en donde
el régimen de tratamiento de administra durante 2 días, 3
días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En ciertas
10 modalidades, el régimen de tratamiento comprende administrar
intermitentemente dosis de la cantidad profiláctica o
terapéuticamente efectiva las moléculas de unión a LAG-3 de
la presente invención (por ejemplo administrar una dosis en
el día 1, día 2, día 3 y día 4 de una semana determinada y no
15 administrar dosis de la cantidad profiláctica o
terapéuticamente efectiva de la molécula de unión a LAG-3 (y
particularmente un anticuerpo de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de
LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb
6 de LAG-3; un anticuerpo de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3,
20 mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, o mAb 6 de
LAG-3 humanizado; un fragmento de unión a LAG-3 de cualquiera
de tal anticuerpo; o en cual la molécula de unión a LAG-3 es
un diacuerpo de LAG-3 biespecífico (*por ejemplo*, un diacuerpo

de Fc biespecífico a LAG-3 x PD-1)). Se abarca especialmente la administración (en el día 5, día 6, y día 7 de la misma semana) de moléculas que comprenden las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de mAb 1 de LAG-3; o que comprende las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de mAb 2 de LAG-3; o que comprende las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de mAb 3 de LAG-3, o que comprende las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de mAb 4 de LAG-3, o que comprende las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de mAb 5 de LAG-3; o que comprende las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de mAb 6 de LAG-3. Típicamente, existen 1, 2, 3, 4, 5 o más cursos de tratamiento. Cada curso puede ser el mismo régimen o un régimen diferente.

[00223] En otra modalidad, la dosis administrada se intensifica durante el primer cuarto, el primer medio o los primeros dos tercios o tres cuartos de los regímenes (por ejemplo durante el primer, segundo y tercer regímenes de un tratamiento de cuatro cursos) hasta que la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva diaria de la molécula de unión a LAG-3 se logra. La **Tabla 4** proporciona 5 ejemplos de regímenes de dosificación diferentes descritos en lo anterior para un curso típico de tratamiento con un diacuerpo.

Tabla 4

Régimen	Día	Dosificación de Diacuerpo (ng de diacuerpo por kg de peso del sujeto por día)				
1	1, 2, 3, 4	100	100	100	100	100
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

[00224] La dosificación y frecuencia de administración de una molécula de unión a LAG-3 de la presente invención puede reducirse o alterarse al mejorar la absorción y penetración en el tejido de la molécula por modificación tal como por ejemplo, lipidación.

[00225] La dosificación de una molécula de unión a LAG-3 de la invención administrada a un paciente puede calcularse para su uso como una terapia de agente simple. Alternativamente,

la molécula puede utilizarse en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente son menores que cuando las moléculas se utilizan como una terapia de agente simple.

5 **[00226]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse localmente al área en necesidad de tratamiento, esto puede lograrse por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, por inyección o por medio de un implante, el implante siendo de un material poroso no
10 poroso gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas elásticas o fibras. De preferencia, cuando se administra una molécula de la invención, debe tenerse cuidado de utilizar materiales en los cuales la molécula no se absorba.

15 **[00227]** Las composiciones de la invención pueden suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990). "*New Methods Of Drug Delivery*", Science 249:1527-1533); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler
20 (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327).

[00228] La composición de la invención puede suministrarse en un sistema de liberación controlada o liberación

sostenida. Cualquier técnica conocida por alguien con experiencia en la técnica puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprende uno o más de las moléculas de unión a LAG-3 de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,526,938; publicación de PCT WO 91/05548; publicación de PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. En una modalidad, puede utilizarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, supra; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous

Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; and Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For
5 *Insulin Delivery*", N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra modalidad los materiales poliméricos pueden utilizarse para lograr la liberación controlada de las moléculas (véase, por ejemplo,, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974);
10 Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", Science 228:190-192; During et al. (1989)
15 "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", J. Neurosurg. 7(1):105-112); Patente de los Estados Unidos No. 5,679,377; Patente de
20 los Estados Unidos No. 5,916,597; Patente de los Estados Unidos No. 5,912,015; Patente de los Estados Unidos No. 5,989,463; Patente de los Estados Unidos No. 5,128,326; Publicación de PCT No. WO 99/15154; y Publicación de PCT No.

WO 99/20253). Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico),
5 poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico) poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinyl pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicolidos), (PLGA), y poliortoésteres. Un sistema de
10 liberación controlada puede colocarse en proximidad del objeto terapéutico (*por ejemplo*, los pulmones) de este modo requiriendo solo una fracción de la dosis sistémica (véase *por ejemplo*, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Las
15 composiciones poliméricas útiles como implante de liberación controlada pueden utilizarse de acuerdo con Dunn *et al.* (Véase U.S. 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación
20 puede ocurrir generalmente en cualquier lado dentro del cuerpo del paciente en necesidad del tratamiento terapéutico. Puede utilizarse un sistema de suministro sostenido de no polimérico, por lo que un implante no polimérico del cuerpo

del sujeto se utiliza como un sistema de suministro de fármaco. Tras la implantación en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipará, o dispersará o se lanzará desde la composición hacia el fluido de tejido circundante, y
5 el material no polimérico se coagulará gradualmente o se precipitará para formar una matriz microporosa sólida (Véase U.S. 5,888,533).

[00229] Los sistemas de liberación controladas se discuten en la revisión por Langer (1990, "New Methods Of Drug
10 *Delivery*", Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida para alguien de experiencia en la técnica puede utilizarse para producir las formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo La Patente de los Estados Unidos No.
15 4,526,938; Las Publicaciones Internacionales Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of
20 *Long-Circulating Emulsions*", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel.

Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997)
"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal
Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel.
Bioact. Mater. 24:759-760, cada una de las cuales se
5 incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

[00230] Donde la composición de la invención es un ácido
nucleico que codifica una molécula de unión al LAG-3 de la
presente invención, el ácido nucleico puede administrarse *in*
vivo para promover la expresión de su molécula de unión al
10 LAG-3 codificada al construirla como parte de un vector de
expresión de ácido nucleico apropiado y administrarla de modo
que se vuelve intracelular, *por ejemplo* por el uso de un
vector retroviral (Véase Patente de los Estados Unidos No.
4,980,286), o por inyección directa, o por el uso de
15 bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola de
genes; Biolistic, Dupont), o en revestimiento con lípidos o
receptores de superficie de célula o agente de transfección,
o al administrarlo en un enlace a un péptido similar a
homeobox el cual se conoce que ingresa a los núcleos (Véase
20 *por ejemplo*, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox
Peptide Regulates Neural Morphogenesis", Proc. Natl. Acad.
Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido
nucleico puede introducir intracelularmente e incorporarse

dentro del ADN de células huésped para expresión por recombinación de homólogo.

[00231] El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una molécula de unión al LAG-3 de la presente invención puede incluir un
5 tratamiento simple o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con tal diacuerpo una vez por semana entre alrededor de 1 a 10 semanas, de preferencia entre 2 a 8 semanas, de mayor preferencia entre alrededor de 3 a 7 semanas, e incluso de mayor preferencia por alrededor de 4, 5 o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse una vez al día, dos veces al día, o 3 veces al día. Alternativamente, la composición farmacéutica puede
15 administrarse una vez al día, dos veces al día, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciara que la dosis efectiva de las moléculas utilizadas para el tratamiento pueden incrementar o disminuir
20 durante el curso de un tratamiento particular.

Ejemplos:

[00232] Teniendo ahora generalmente descrita la invención,

la misma se entenderá más fácilmente a través de las referencias a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que se limiten de la presente invención a menos que se especifique.

5 Será aparente para aquellos con experiencia en la técnica que muchas modificaciones, tanto a materiales como métodos, pueden practicarse sin apartarse del alcance de la presente descripción.

10 **A. Ejemplo 1: Caracterización del Anti cuerpo Monoclonal Anti-LAG-3 de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG 3, y mAb 6 de LAG 3.**

[00233] Los anticuerpos monoclonales de 6 murinos se
15 aislaron ya que son capaces de unirse inmuno-específicamente tanto a LAG-3 de humano como de mono cynomolgus, y de acuerdo con las designaciones, **"mAb 1 de LAG-3", "mAb 2 de LAG-3", "mAb 3 de LAG-3", "mAb 4 de LAG-3", "mAb 5 de LAG-3", y "mAb 6 de LAG-3"**. Los CDR de estos anticuerpos se encontró que
20 difieren y se proporcionan en lo anterior. mAb 1 de LAG-3 que se humanizo produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como **"VH-1 de mAb 1hLAG-3", y "VH-2 de mAb 1 de hLAG-3"**, y cuatro dominios de VL humanizado designados en

la presente como "VL-1 de mAb 1 de hLAG-3", "VL-2 de mAb 1 de hLAG-3", "VL-3 de mAb 1 de hLAG-3" y "VL-4 de mAb 1 de hLAG-3". Las cadenas ligeras y pesadas humanizadas pueden ser usadas en cualquier combinación y combinaciones particulares de cadenas humanizadas que son referidas para referencia a los dominios de VH/VL específicos, por ejemplo un anticuerpo humanizado que comprende VH-1 de mAb 1 de hLAG-3, y VL-2 de mAb 1 de hLAG-3 se denomina específicamente como "mAb 1 (1.2) de hLAG-3". Las mAbs humanizadas fueron fueron diseñadas ya sea para una Región Fc IgG1 humana (que comprende las sustituciones L234A/L235A (AA) o una Región Fc IgG4 humana (que comprende la sustitución S228P)

[00234] La cinética de unión de los anticuerpos mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3, MAb 6 de LAG-3, diversos humanizados y anticuerpos de referencia Mab A de LAG-3 se investigaron utilizando el análisis de Biacore. Los anticuerpos anti-LAG-3 se capturaron y se incubaron con LAG-3 humano soluble (shLAG-3-His) y la cinética de unión se determinó mediante análisis de Biacore. Los k_a , k_d y KD calculados se presentaron en la **Tabla 5**.

Tabla 5			
Anticuerpo Anti-LAG-3	k_a ($\times 10^5$)	k_d	KD (nM)

		($\times 10^{-4}$)	
mAb A de LAG-3	8.7	5.4	0.6
mAb 1 ^a de LAG-3	20	0.26	0.013
mAb 1 ^b de LAG-3	31	0.27	0.01
mAb 2 ^a de LAG-3	11	21	1.9
mAb 3 ^a de LAG-3	7.7	34	4.4
mAb 4 ^a de LAG-3	12	9.3	0.8
mAb 5 ^a de LAG-3	14	13	0.9
mAb 6 ^a de LAG-3	42	0.84	0.02
mAb 1 (1.2) ^{d, e} de hLAG-3	23	0.13	0.01
mAb 1 (2.2) ^{d, e} de hLAG-3	8.2	2.6	0.3
mAb 1 (1.1) ^{d, e} de hLAG-3	17	0.74	0.04
mAb 1 (1.4) ^{c, e} de hLAG-3	16	0.59	0.04
mAb 1 (1.4) ^{c, f} de hLAG-3	17	0.86	0.05

a = capturado en Fc anti-ratón de cabra Fab2 inmovilizado b

= capturado en proteína G inmovilizado

c = capturado en FC anti-humano de cabra Fab2 inmovilizado d

= capturado en proteína A inmovilizada

5 e = IgG1 humano (AA)

f = IgG4 (S228P)

[00235] Los resultados demuestran que mAb 1 de LAG-3 y mAb 6 de LAG-3 muestran mejor cinética de unión que mAb A de LAG-3 de anticuerpo de referencia. Además, el mAb 6 de LAG-3 humanizado muestra mejor cinética de unión reactiva-cruzada

con LAG-3 de mono cynomolgus.

[00236] La especificidad de epítipo de mAb 1 de LAG-3, mAb 6 de LAG-3 y mAb A de LAG-3 de anticuerpo de referencia se examinó utilizando el análisis Biacore. Para determinar si
5 los anticuerpos se unen a diferentes epítipos de LAG-3, se capturó shLAG-3-His por el anticuerpo de anti-PentaHis de ratón inmovilizado en el chip de sensor de CM5 de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante. Brevemente, los grupos carboxilo en la superficie de chip de sensor se
10 activaron con una inyección se una solución que contiene N-etilo-N-(dietilamino-propil)carbodimida 0.2 M y N-hidroxi-succinimida 0.05 M. Se inyectaron los anticuerpos Anti-PentaHis sobre la superficie de CM5 activada en 10 mM de acetato de sodio, pH 5.0, en una tasa de flujo de 5 µL/min, seguidos por etanolamina 1 M para desactivación de los grupos
15 amino-reactivos restantes. Los experimentos de unión se realizaron en el regulador de HBS-EP, el cual contiene 10 mM de HEPES, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, y tensioactivo P20 al 0.005%. Cada anticuerpo (mAb 1 de LAG-3, mAb 6 de LAG-3 y mAb A de LAG-2) se preinyectaron sobre hLAG-3-His capturado durante 180 segundos en una tasa de flujo de 5 µL/min en una concentración de 1µM seguido por la ejecución del regulador y la inyección del anticuerpo de competencia en
20

las mismas condiciones. Las respuestas de unión del anticuerpo de competencia se comparó con su respuesta de unión al hLAG-3-His preinyectado con el regulador para identificar anticuerpos que compiten por el mismo epítipo. La
5 regeneración de la superficie anti-PentaHis inmovilizada se realizó por inyección de pulso de 10 mM de glicina, pH 1.5. Las curvas de referencia se obtuvieron por inyección de analitos sobre la superficie tratada con proteína no inmovilizada. Las curvas de unión se generaron por el
10 software BIAevaluation v4.1 de dato de sensograma en tiempo real.

[00237] Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 5**. Los resultados del experimento indican que el mAb A de LAG-3 de anticuerpo biotinilado fue capaz de unirse a
15 shLAG-3-His incluso en la presencia de cantidades en exceso de los anticuerpos no biotinilados mAb 1 de LAG-3 y mAb 6 de LAG-3. En contraste, mAb 1 de LAG-3 bloquea la unión de mAb 6 de LAG-3. De este modo, los resultados mostraron que mAb 1 de LAG-3 y mAb 6 de LAG-3 probablemente se unen al mismo, o se
20 traslaparon al epítipo de LAG-3, y compiten entre sí para unirse al LAG-3. Tanto mAb 1 de LAG-3 como mAb 6 de LAG-3 se encontró que se unen a un epítipo que es distinto del que se enlaza por mAb A de LAG-3.

[00238] Para caracterizar además los anticuerpos anti-LAG3, su capacidad para bloquear la unión entre LAG-3 y MHC de clase II se evaluó en dos ensayos diferentes. En un ensayo, la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de una

5 proteína de fusión de LAG3-Fc humana soluble a MHC de clase II inmovilizado en una superficie se examinó. Para este ensayo, mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3 y mAb 5 de LAG-3 cada una (en 0-67 nM, 2 veces las diluciones seriales) se mezclaron con una proteína de fusión

10 de LAG-3-Fc humana soluble, (a 5 µg/mL) y se incubaron por separado, con MHC de clase II inmovilizada (1 µg/mL). La cantidad de la unión de LAG-3 al MHC clase II inmovilizado se evaluaron utilizando un anticuerpo secundario de HRP-gama Fc antihumano de cabra. En experimentos adicionales mAb A de

15 LAG-3 y los anticuerpos humanizados, mAb 1 (1.4) de hLAG-3 y mAb 6 (1.1) de hLAG-3 (en 0.0096-7.0 nM, tres veces las diluciones seriales) se mezclaron con proteínas de fusión LAG-3-His humana soluble (0.2 µg/ml) y se sometieron a ensayo para unir a MHC de clase II inmovilizada como se describe en

20 lo anterior. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 6**.

[00239] En otro ensayo, la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 de la presente invención para bloquear la unión de

una proteína de fusión LAG3-Fc humano soluble (shLAG-3-Fc) para MHC de clase II nativo en una superficie de células se examinó. Para este ensayo, mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3 y el mAb A de LAG-3 de anticuerpo de referencia cada uno (en 0.1-26.7 ng/ml, 2 veces las diluciones seriales) se mezclaron con una proteína de fusión de LAG-3-Fc humana soluble biotinilada, (en 0.5 µg/ml) y se incubaron por separado con células Daudi positivas de MHC-II. La cantidad de la unión de LAG-3 a la superficie de la célula Daudi se determinó utilizando el anticuerpo secundario de estreptavidina PE-conjugado por análisis de FACS. En experimentos separados adicionales mAb 1 de LAG-3, mAb 6 de LAG-3 y mAb A de LAG-3; o mAb 1 de LAG-3 y los anticuerpos humanizados mAb 1 (1.4) de hLAG-3, mAb 1 (1.2) de hLAG-3, mAb 1 (2.2) de hLAG-3, mAb 1 (1.1) de hLAG-3 se sometieron a ensayo como se describe en lo anterior. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 7, Paneles A-7** respectivamente.

[00240] Los resultados de este ensayo de inhibición (**Figura 6 y Figura 7**) muestran que todos los anticuerpos anti-LAG-3 probados bloquearon la unión de una proteína de fusión de shLAG-3-Fc para unir MHC de clase II.

B. Ejemplo 2: Metodología de Citometría de Flujo

[00241] Los experimentos para determinar los niveles de expresión de los inhibidores de punto de control: PD-1 y LAG-3 en células en los experimentos descritos en lo siguiente
5 usados los siguientes anticuerpos comerciales etiquetados apropiadamente fluorescentes (picoeritrin-cianina7 anti-CD4 de pitoeritrin cianamida7 (PE-Cy7), conjugado [clon SK3] o anti-CD4 de isocianato de fluoresceína (FITC)-conjugado [clon RPA-T4], anti-LAG-3 de ficoeritrina (PE)-conjugado clon
10 3DS223H] anti-PD-1 de picoeritritina (PE)-conjugado [clon EH12.2H7] o aloficocianina (APC)-conjugada (eBiosciences o BioLegend)) y los controles de isotipo apropiados. Todos los anticuerpos se utilizaron en las concentraciones recomendadas por el fabricante. La tinción celular se realizó en el
15 regulador de FACS (10% de FCS en PBS) en hielo durante 30 minutos en la oscuridad por la adición de anticuerpo primario. Después de dos lavadas, las células ya sea que se tiñeron con reactivos secundarios apropiados en hielo durante 30 minutos en la oscuridad o se analizaron inmediatamente en
20 un citómetro de flujo. Para excluir las células muertas, todas las muestras se co-tiñeron con un tinte de viabilidad: 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences, o BioLegend,) o 4', 6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato (DAPI) (Life

Technologies). Todas las muestras se analizaron en cualquiera de un citómetro FACS Calibur o Fortessa Flow (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el Software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

5

C. Ejemplo 3: Expresión de LAG-3 y unión de Anticuerpo para estimular las Células T.

[00242] La expresión de LAG-3 y la capacidad de los anticuerpos de LAG-3 aislados para unir específicamente LAG-3
10 en la superficie de las células T CD3/CD28-estimuladas se examinaron. Las células T se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (las PBMCs) brevemente, las PBMCs se purificaron utilizando el método de configuración de gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE
15 Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de sangre entera obtenida bajo el consentimiento informado de donadores saludables (Biological Specialty Corporation) y las células T entonces se purificaron utilizando el equipo de células T humanas intactas Dynabeads®
20 (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para estimulación, las células T aisladas se cultivaron durante 10-14 días en la presencia de IL-2 humano recombinante 30 U/ml] (Peprotech) y cuentas de activador de

células T humanas Dynabeads® (Life Technologies) de acuerdo con instrucciones del fabricante. La expresión de LAG-3 en células T CD4+ intactas recién aisladas, y células T CD4+ estimuladas (tomadas a partir del cultivo del día 11 o 14) se
5 examinaron por citometría de flujo como se describe en lo anterior utilizando anti-LAG-3 PE-conjugado y anti-CD4 FITC-conjugado.

[00243] Los resultados de estos estudios se muestran en las **Figura 8**. No se observó expresión de LAG-3 en células T CD4+ intactas (**Figura 9, Panel A**). Sin embargo, las células T CD4+
10 estimuladas CD3/CD8 a partir de 2 donadores diferentes (D:58468 y D:43530) mostraron un incremento dramático en la expresión de LAG-3 (**Figura 8 Paneles B y C**).

[00244] La capacidad de mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb
15 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, y mAb 5 de LAG-3, para unirse específicamente para células T de CD4+ estimuladas se investigó. Las células T estimuladas (preparadas como se describe en lo anterior a partir de donadores D:58468) tomados a partir del cultivo del día 14, y las células
20 intactas recientes (preparadas como se describe en lo anterior a partir del donador D:43530) se sometieron a citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-LAG-3 aislados y las siguientes reactivos secundarios etiquetados

apropiadamente fluorescentes (IgG (H+L) de anti-ratón conjugado con PC) (Jackson ImmunoResearch Labs)) y anti-CD4 conjugado con FITC. Como se muestra en la **Figura 9**, y **Figura 10**, cada uno de los anticuerpos anti-LAG-3 examinados se
5 enlazan solamente para células T de CD4+ estimuladas, pero no intactas.

[00245] Los resultados de estos estudios demuestran que LAG-3 se sobre-regula sobre células T estimuladas y que los anticuerpos anti-LAG-3 de la presente invención
10 específicamente se unen solo a las células T estimuladas.

D. Ejemplo 4: Actividad Funcional de Anticuerpos anti-LAG

[00246] La enterotoxina de tipo B de *Staphylococcus aureus*
15 (SEB) es un superantígeno microbiano capaz de activar una gran porción de células T (5-30%). SEB se une a MHC II fuera del surco de unión a péptido y de esta manera es dependiente de MHC II, pero intacto y mediado por TCR. La estimulación de SEB de las células T resulta en proliferación de células T
20 oligoclonales y producción de citosina (aunque la variabilidad del donador puede observarse). La expresión de los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-1 solo si en combinación de los PMBC SEB-estimulados se examinó.

[00247] Los PBMCs purificados como se describe en lo anterior se cultivaron en un medio de RPME y más 10% de FBS inactivado con calor + 1% de penicilina/estreptomicina en matraces grueso de T-25 durante 2-3 días solos o con SEB (Sigma-Aldrich) en 0.1 ng/ml (estimulación primaria). Al final de la primera ronda de estimulación de SEB, se lavaron los PBMC dos veces con PBS y se colocaron en placas inmediatamente en placa de cultivo para tejido de 96 pozos en una concentración de $1-5 \times 10^5$ células/pozo en un medio solo, el medio con SEB en 0.1 ng/ml (estimulación secundaria) y sin anticuerpo o medio con SEB y un anticuerpo de IgG control, y el cultivo para uno 2-3 días adicionales. A las 48 horas de estimulación de SEB mayor post-primaria como a las células se examinaron para la expresión PD-1 y LAG-3 por citometría de flujo utilizando anti-LAG-3 PE-conjugado y anti-CD3 FITC-conjugado; o anti-PD-1 APC-conjugado y anti-CD3 FITC-conjugado. En el día 5, el cultivo post-secundario en la placa de 96 pozos con estimulación de SEB, los pozos se trataron sin anticuerpo o con anticuerpo control se examinaron utilizando citometría de flujo por la expresión PD-1 y LAG-3 utilizando el anti-LAG-3 PE-conjugado y anti-PD-1 APC-conjugado.

[00248] Los resultados de citometría de flujo de dos

donadores representativos (D:34765 y D:53724) se mostraron en la **Figura 11** (D:34765) y la **Figura 12** (D:53724). Estos resultados demuestran que LAG-3 y PD-1 se sobre-regulan durante 48 horas posteriores la estimulación de SEB con una vista mejorada adicional en el día 5 posterior al cultivo con estimulación de SEB. En estos estudios, el donador 1 tuvo más células positivas dobles de LAG-3/PD-1 después de la estimulación de SEB. La adición de un anticuerpo control posterior a la estimulación de SEB no alteró la expresión de LAG-3 o PD-1 (**Figuras 11 y 12**, comparar **Paneles C y D**).

[00249] Sobre-regulación de la proteína del punto de control inmune LAG-3 Y PD-1 después de la estimulación de SEB de PBMC limita la liberación de citosina tras la reestimulación. La capacidad de mAb 1 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 6 de LAG-3 o anticuerpo monoclonal de PD-1 designado "**mAb 5 de PD-1**", y los anticuerpos de referencia mAb 1 de PD-1 (que comprende la variante (AA) de Fc 235A/235A)), mAb 2 de PD-1, mAb A de LAG-3, y el anticuerpo anti-LAG3 comercial 17B4 (#LS-C18692, LS Bio, designada "**mAb B de LAG-3**") para mejorar la liberación de citocina a través de la inhibición del punto de control se examinó.

[00250] Se estimularon los PBMC con SEB como se describe en lo anterior excepto que durante las estimulaciones

secundarias las células se colocaban en placas sin anticuerpos, con un anticuerpo de control de isotipo, o con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-1 solos o en combinación. Al final de la segunda estimulación, los sobrenadantes se cultivaron para medir la secreción de citosina utilizando los equipos de ELISA DuoSet humanos para IFN γ , TNF α , IL-10, e IL-4 (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La **Figura 13** muestra IFN γ (**Figura 13A**) y TNF α (**Figura 13B**), los perfiles de secreción de los PBMC estimulados con SEB a partir de un donante representativo (D:38166), tratado sin anticuerpo o uno de los anticuerpos siguientes: Control isotipo, mAb 1 de PD-1, mAb 2 de PD-1, mAb A de LAG-3, mAb B de LAG-3, mAb 1 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3 o mAb 6 de LAG-3. Para este estudio los anticuerpos se utilizaron en 0.009, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5, 10, y 40 μ g/ml. La **Figura 14** muestra los perfiles de secreción de IFN γ de los PBMC estimulados con SEB de otro donante representativo (D:58108), tratado con: sin anticuerpo; anticuerpo de control de isotipo; mAb 2 de PD-1 y/o mAb A de LAG-3; mAb 5 de PD-1 y/o mAb 1 de LAG-3; / mAb 5 de PD-1 y/o mAb 3 de LAG-3. Para este estudio los anticuerpos se utilizaron en 10 μ g/ml.

[00251] Los resultados de estos estudios demuestran que los

anticuerpos anti-PD-1 mejoran dramáticamente la función del sistema inmune como se hace evidente por la producción de IFN γ incrementado en la (**Figura 13A** y **Figura 14**), y de TNF α (**Figura 13B**) los PBMC estimulados con SEB tras la reestimulación. Sorprendentemente, mAb 1 de LAG-3 también se ve que incrementa la producción de citosina a través de donadores múltiples a niveles comparables con los anticuerpos anti-PD-1 mientras que los mAbs anti-LAG-3 de referencia, mAb A de LAG-3 y mAb B de LAG-3 y varios de los anticuerpos aislados (mAb 3 de LAG-3, LAG-4 y LAG-6) proporciona solamente una mejora ligera de liberación de citosina. Además, la combinación de anticuerpos anti-LAG-3 con anti-PD-1 resulto en una mejora adicional de liberación de citosina (**Figura 14, Paneles A y B**) de los PBMC estimulados con SEB tras la reestimulación. mAb 1 de LAG-3 proporcionó la mejora más grande en la liberación de citosina cuando se combina con un anticuerpo anti-PD-1 como se compara en la mAb 3 de LAG-3 y el anticuerpo de referencia mAb A de LAG-3.

[00252] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente para referencia al mismo grado como si cada publicación individual o solicitud de patente se indicará específica e individualmente para incorporarse para referencia en su

totalidad. Aunque la invención se ha descrito en relación con las modalidades específicas de las mismas, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud se pretende que cubra cualesquier variaciones, usos y adaptaciones de la invención siguiente, en general los principios de la invención y que incluyen tales aparatos de la presente descripción y que entran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la cual la invención pertenece y como puede aplicarse a las características esenciales establecidas en lo anterior.

Lo que se Reivindica es:

Reivindicación 1. Una molécula de unión de LAG-3 anti-humano que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, en donde

5 el Dominio de Cadena Pesada Variable comprende un Dominio de CDR_H1, un Dominio de CDR_H2 y un Dominio de CDR_H3, y el Dominio de Cadena Ligera Variable comprende un Dominio de CDR_L1, un Dominio de CDR_L2, y un Dominio de CDR_L3, en donde:

(A) (1) el Dominio de CDR_H1, Dominio de CDR_H2, y 10 Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena pesada de mAb 1 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y SEQ ID NO:6;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, Dominio de CDR_L2, y Dominio de CDR_L3 son las CDR de cadena ligera de mAb 1 de LAG-3, y 15 tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11;**

o

(B) (1) el Dominio de CDR_H1, Dominio de CDR_H2, y Dominio de CDR_H3 son las CDR de cadena pesada de mAb 2 de 20 hLAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, y SEQ ID NO:16;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, Dominio de CDR_L2, y Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 2 de hLAG-3, y

tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, y SEQ ID NO:21;**

o

(C) (1) el Dominio de CDR_H1, Dominio de CDR_H2, y
5 Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 3 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, y SEQ ID NO:56;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, Dominio de CDR_L2, y Dominio de CDR_L3 son las CDR de cadena ligera de mAb 3 de LAG-3, y
10 tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, y SEQ ID NO:61;**

o

(D) (1) el Dominio de CDR_H1, Dominio de CDR_H2, y Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 4 de
15 LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, y SEQ ID NO:66;** y

(2) el Dominio de CDR_L1, Dominio de CDR_L2, y Dominio de CDR_L3 son las CDR de cadena ligera de mAb 4 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID
20 NO:69, SEQ ID NO:70, y SEQ ID NO:71;**

o

(E) (1) el Dominio de CDR_H1, Dominio de CDR_H2, y Dominio de CDR_H3 son las CDR de Cadena Pesada de mAb 5 de

LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, y SEQ ID NO:76;** y

(2) el Dominio de CDR_{L1}, Dominio de CDR_{L2}, y Dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de mAb 5 de LAG-3, y
5 tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, y SEQ ID NO:81;**

o

(F) (1) el Dominio de CDR_{H1}, Dominio de CDR_{H2}, y Dominio de CDR_{H3} son las CDR de Cadena Pesada de mAb 6 de
10 LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:85, y SEQ ID NO:86;** y

(2) el Dominio de CDR_{L1}, Dominio de CDR_{L2}, y Dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de mAb 6 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID
15 NO:89, SEQ ID NO:90, y SEQ ID NO:91;**

o

(G) (1) el Dominio de CDR_{H1}, Dominio de CDR_{H2}, y Dominio de CDR_{H3} son las CDR de Cadena Pesada de VH1 de mAb 6 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de
20 aminoácidos: **SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y SEQ ID NO:6;** y

(2) el Dominio de CDR_{L1}, Dominio de CDR_{L2}, y Dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de mAb 6 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID**

NO:104, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11;

Reivindicación 2. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 1, en donde la molécula es un anticuerpo.

5 Reivindicación 3. La molécula de unión a LAG-3 anti-humana de conformidad con la reivindicación 2, en donde la molécula es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Reivindicación 4. La molécula de unión a LAG-3
10 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la molécula comprende un Dominio Variable de Cadena Pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:92, o SEQ ID NO: 94.**

Reivindicación 5. La molécula de unión a LAG-3
15 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde la molécula comprende un Dominio Variable de Cadena Ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, o SEQ ID NO:102.**

20 Reivindicación 6. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la molécula es una molécula de unión biespecífica, capaz de unirse simultáneamente a LAG-3

humano y a un segundo epítopo.

Reivindicación 7. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 6, en donde el segundo epítopo es un epítopo de una molécula implicada en regular un punto de control inmune presente en la superficie de la célula inmune.

Reivindicación 8. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 6, en donde el segundo epítopo es una epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA.

Reivindicación 9. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde la molécula es un diacuerpo, el diacuerpo que es un complejo covalentemente unido que comprende dos o tres o cuatro cadenas de polipéptido diferentes.

Reivindicación 10. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 9, en donde la molécula comprende una región de Fc.

Reivindicación 11. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 9, en donde la molécula comprende una Dominio de Unión a Albúmina (ABD).

Reivindicación 12. La molécula de unión a LAG-3
5 anti-humano de conformidad con la reivindicación 11, en donde la ABD es una ABD desinmunizada.

Reivindicación 13. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 10, en donde la región de Fc es una
10 Región de Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácido que reduce la afinidad de la Región Fc de variante para un FcγR o estabilizar la Región Fc.

Reivindicación 14. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 13, en
15 donde: las modificaciones que reducen la afinidad de la Región de Fc variante para un FcγR comprende las sustituciones de L234A; L235A; o L234A y L235A; en donde la numeración es aquella del índice de la UE de acuerdo con Kabat.

20 Reivindicación 15. La molécula de unión de LAG-3 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la molécula se utiliza para estimular una respuesta inmune mediada por células T de un

sujeto en necesidad del mismo.

Reivindicación 16. La molécula de unión de LAG-3 anti-humano de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la molécula se utiliza en el tratamiento de una
5 enfermedad o padecimiento asociado con el sistema inmune suprimido.

Reivindicación 17. La molécula de unión a LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 16, en donde la enfermedad o padecimiento es cáncer o una infección.

10 Reivindicación 18. La molécula de unión de LAG-3 anti-humano de conformidad con la reivindicación 17, en donde un cáncer se caracteriza por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de glándula adrenal, un cáncer asociado al SIDA,
15 un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer óseo, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, unos tumores de cuerpo carotídeo; un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de célula renal
20 cromóforo, un carcinoma de célula clara, un cáncer de colon, un cáncer colorectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplástico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Erwing, un condrosarcoma mixoide

extraesquelético, una fibrogenesis imperfecta ósea, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer de vesícula o de conducto biliar, cáncer gástrico, un trastorno trofoblástico gestacional, un tumor de célula germinal, un cáncer de cabeza
5 y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer hepático, un linfoma, un cáncer pulmonar, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una
10 neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplástico, un neuroblastoma, tumores neuroendócrinos, un cáncer ovárico, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar tiroideo, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un
15 feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer prostático, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de células escamosas, un cáncer de
20 estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma de timo, un timoma, un cáncer de tiroides metastásico, y un cáncer uterino.

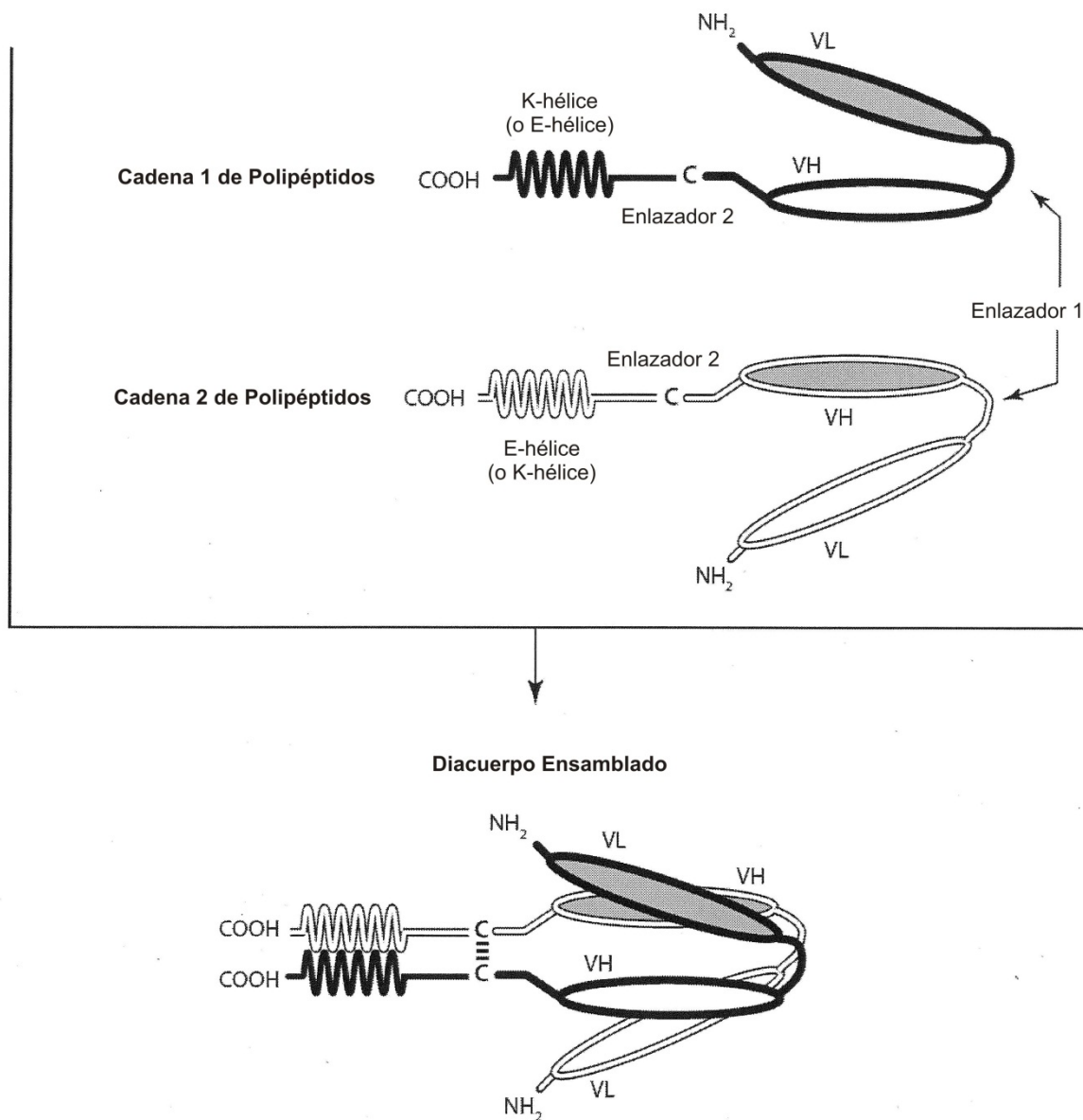
Reivindicación 19. La molécula de unión de LAG-3

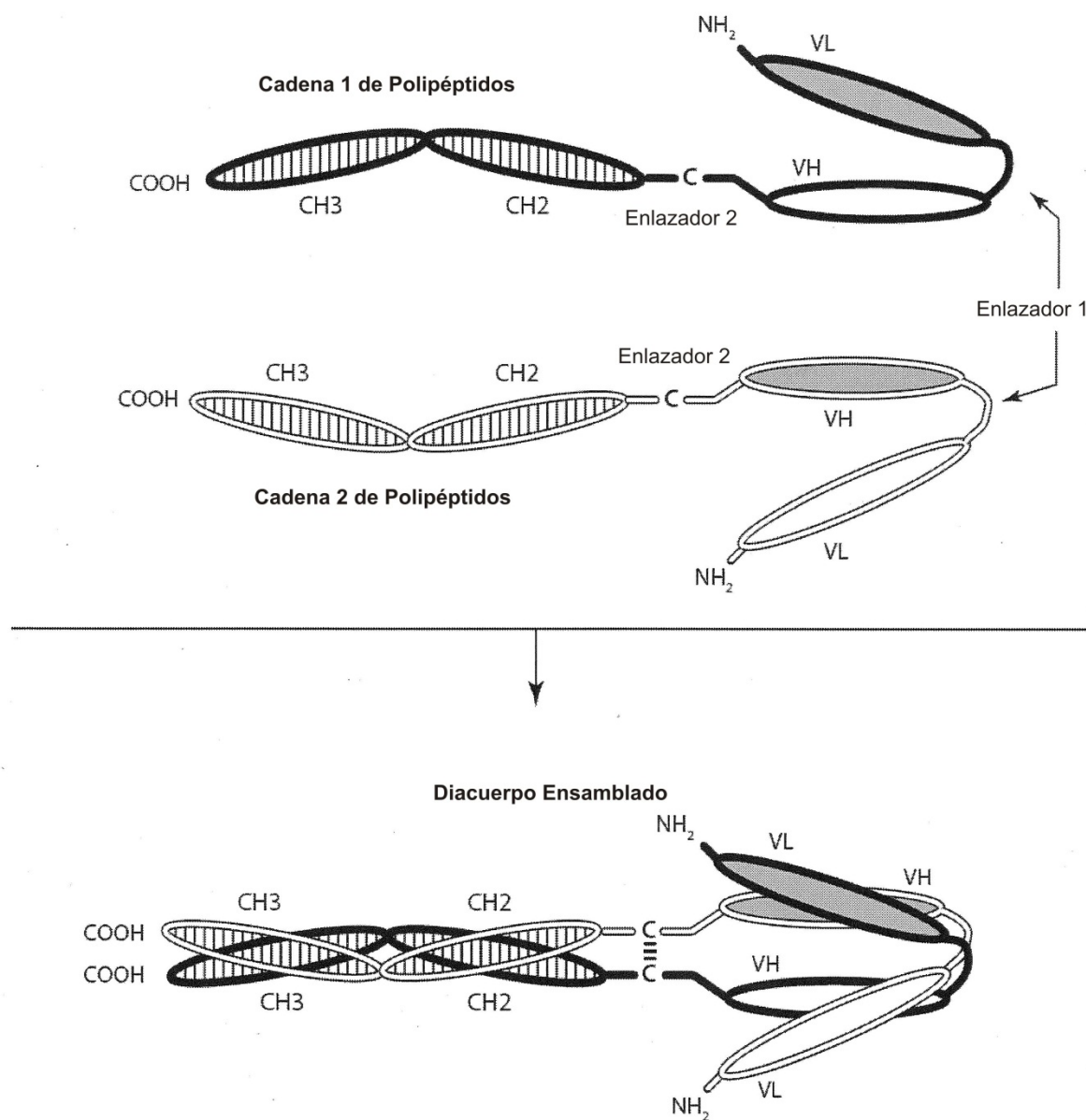
anti-humano de conformidad con la reivindicación 17, en donde la enfermedad o padecimiento es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer renal, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, 5 cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer rectal, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de célula pilosa (HCL), neoplasia de 10 célula dendrítica plasmacitoide blástica (BPDCN), linfomas de no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de célula del manto (MLC), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, o linfoma de Burkitt.

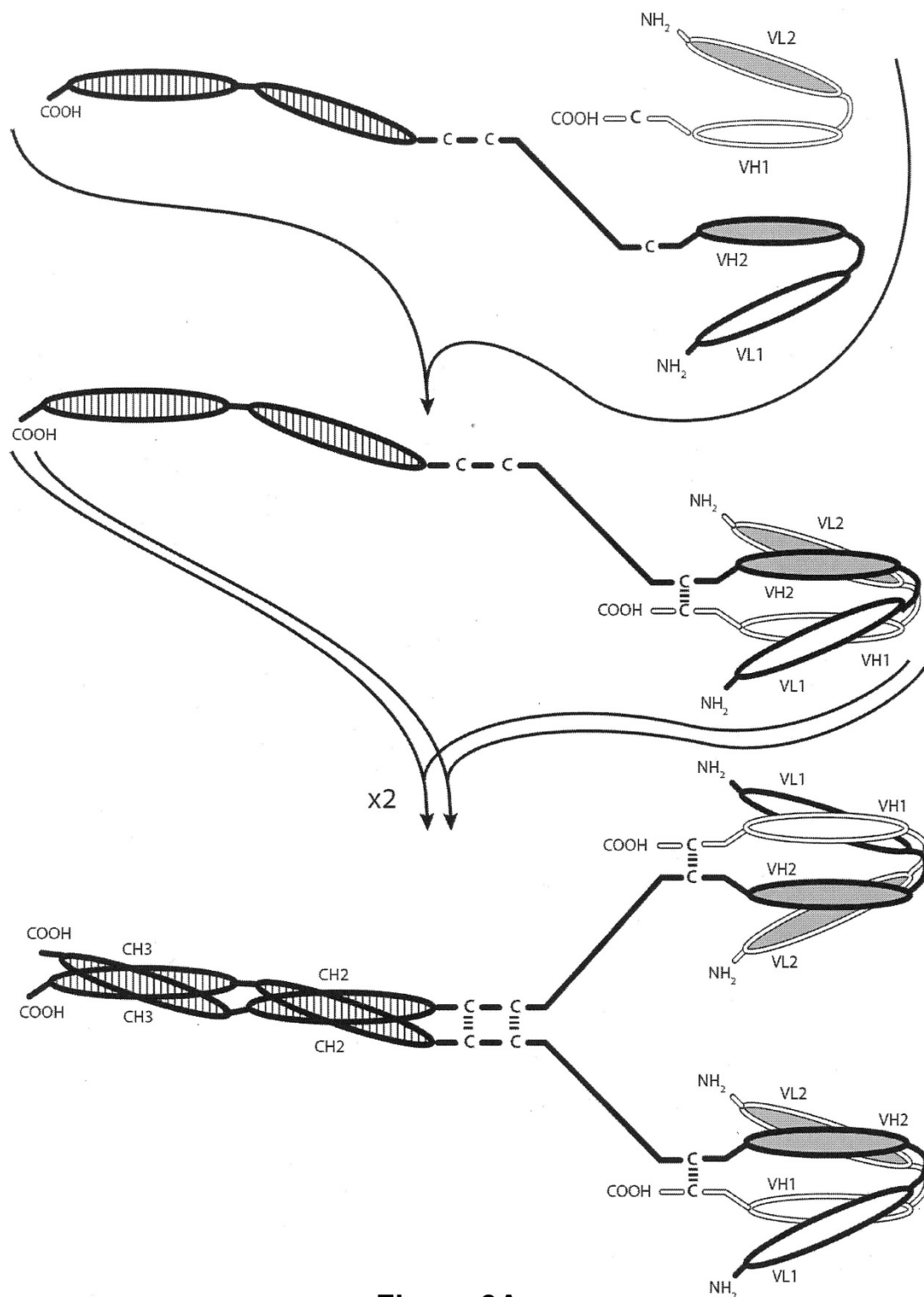
Reivindicación 20. La molécula de unión a LAG-3 15 anti-humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la molécula se etiqueta detectablemente y se utiliza en la detección de LAG-3.

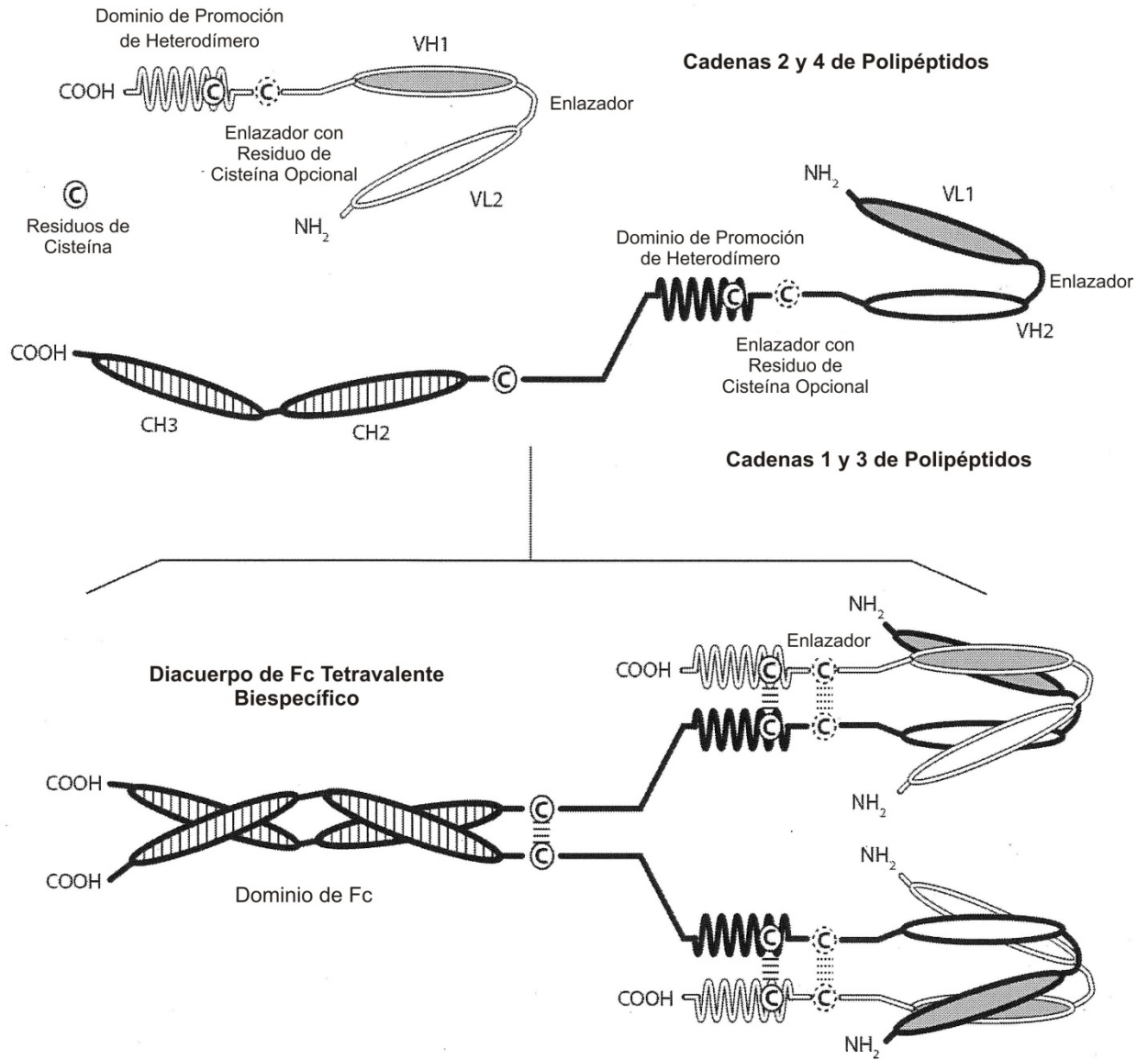
RESUMEN DE LA INVENCION

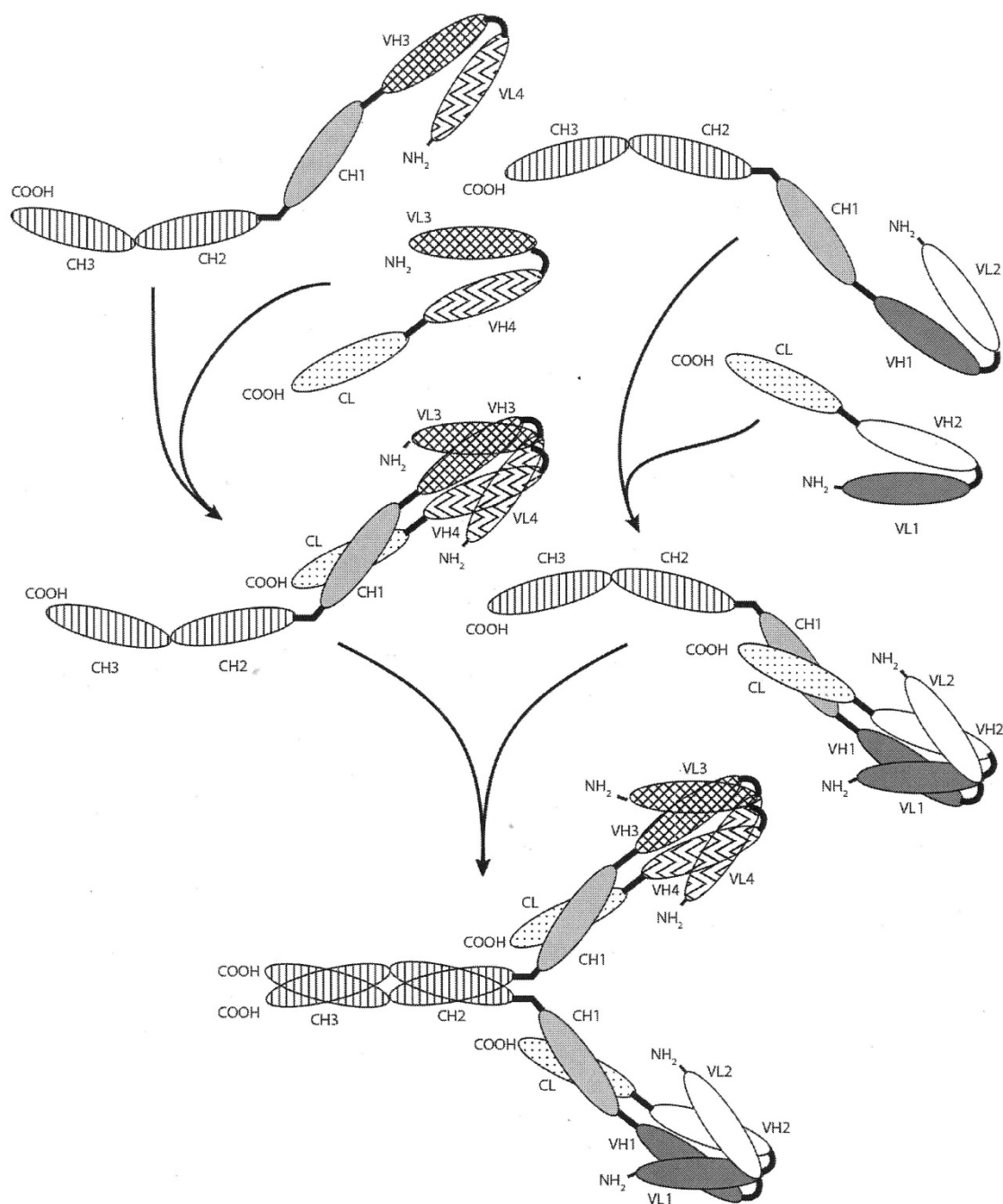
La presente invención se dirige a los anticuerpos anti-LAG-3, mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 de LAG-3 y mAb 6 de LAG-3, y a versiones humanizadas y quiméricas de tales anticuerpos. La invención pertenece adicionalmente a las moléculas de unión a LAG-3 que comprenden los fragmentos de unión a LAG-3 de tales anticuerpos anti-LAG-3, inmunoconjugados, y a moléculas biespecíficas, que incluyen diacuerpos, BiTES, anticuerpos biespecíficos, etc., que comprenden (i) tales fragmentos de unión a LAG-3, y (ii) un dominio capaz de unir un epítipo de una molécula implicada en regular un punto de control inmune presente en la superficie de células inmunes. La presente invención también pertenece a métodos para detectar LAG-3, así como también métodos para utilizar moléculas que unen LAG-3 para estimular respuestas inmunes.

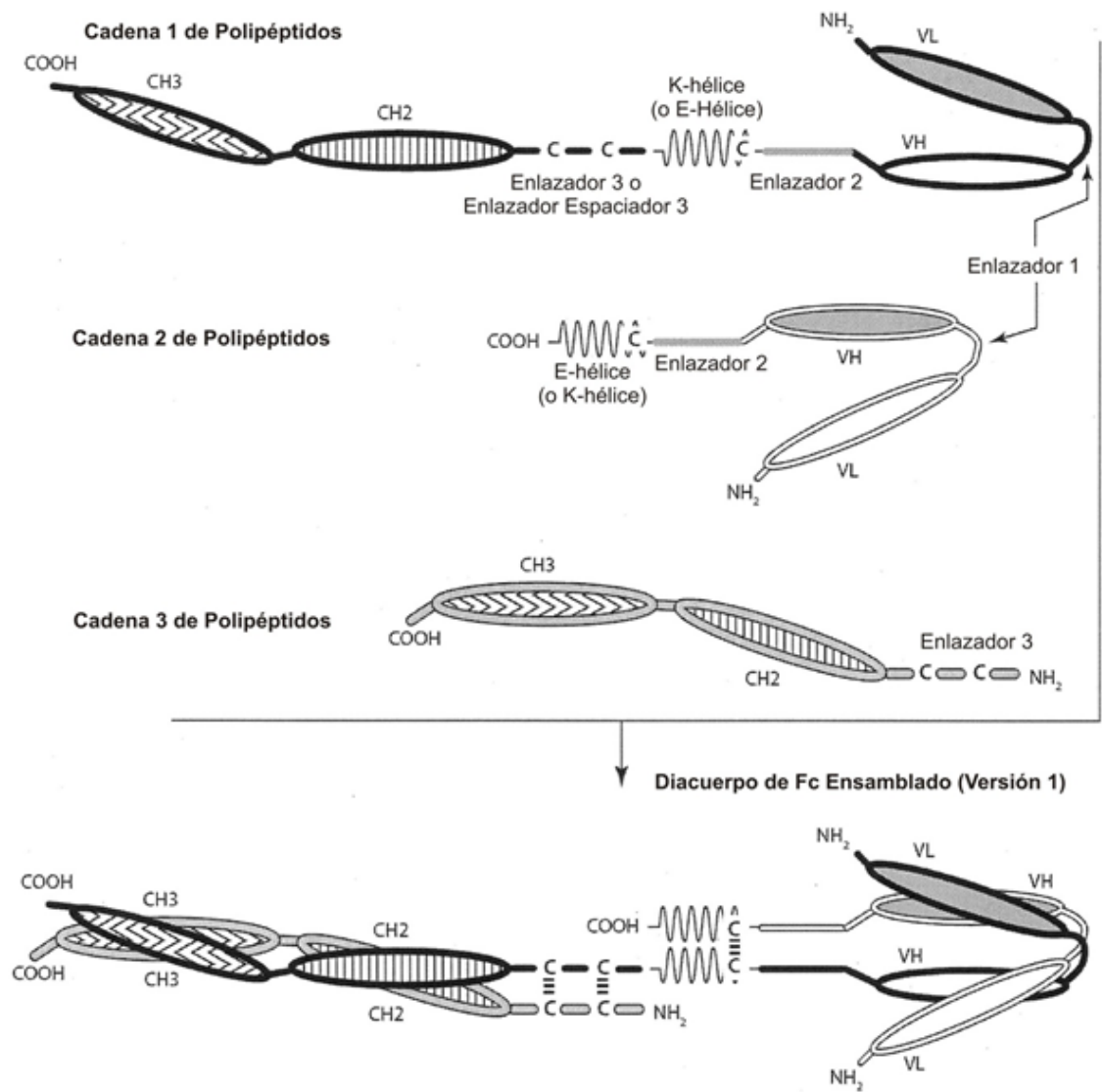
**Figura 1**

**Figura 2**



**Figura 3B**

**Figura 3C**

**Figura 4A**

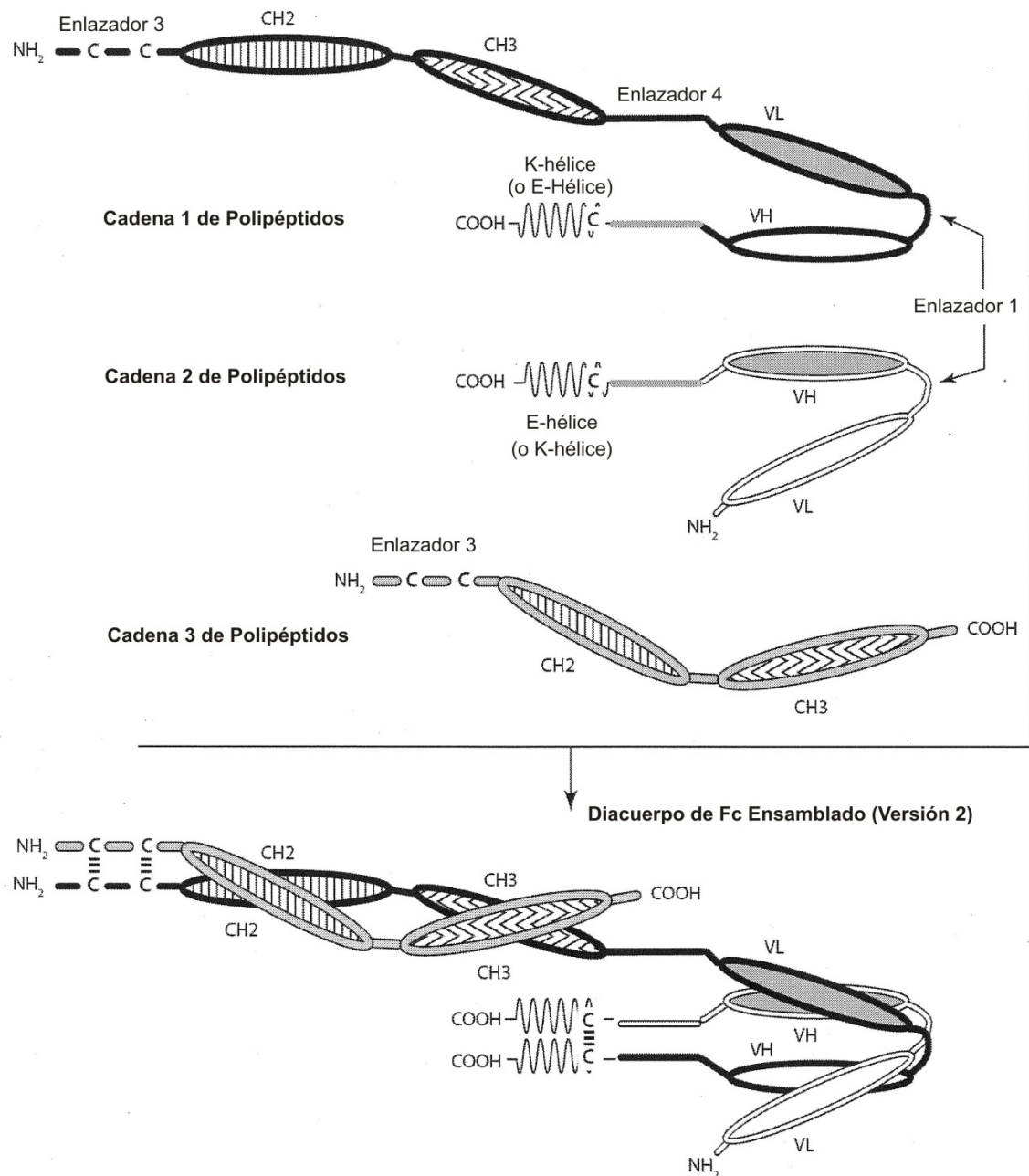
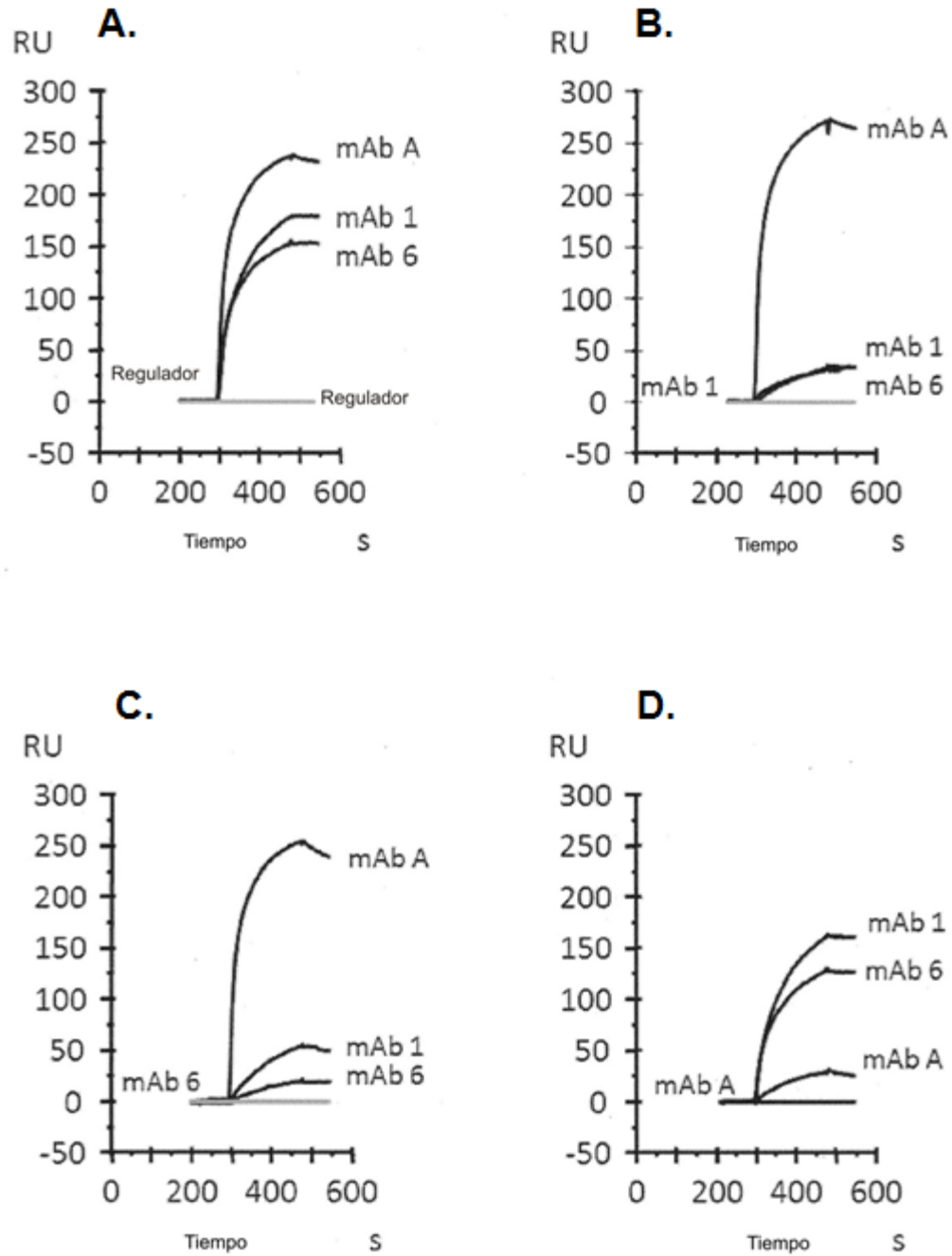
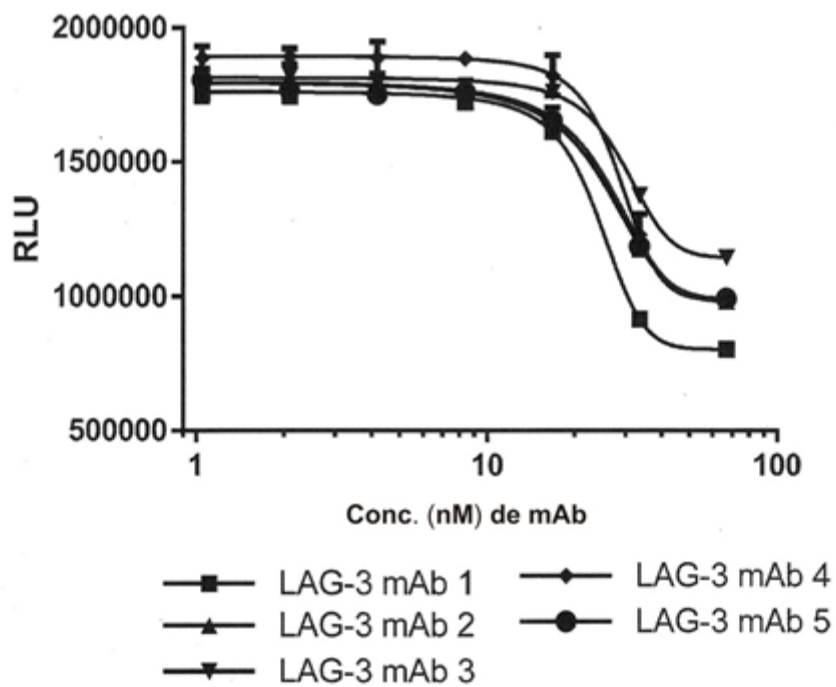
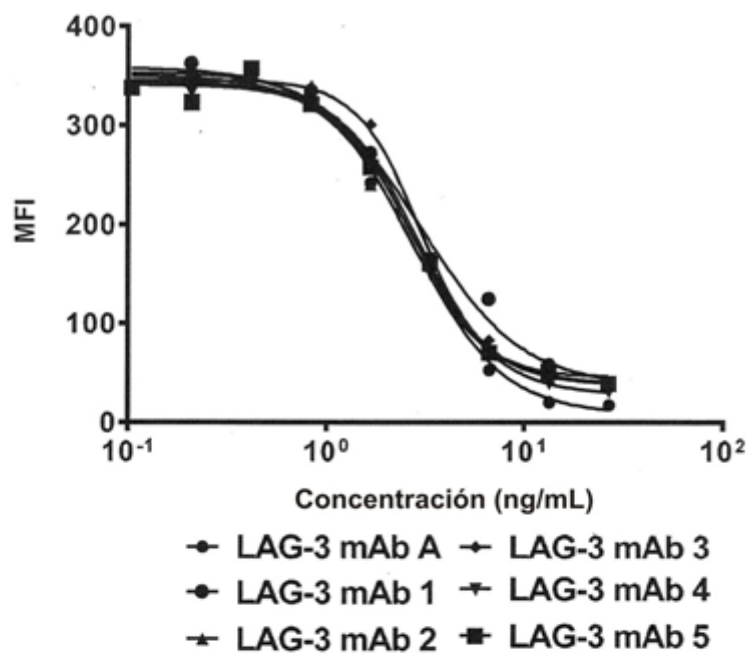
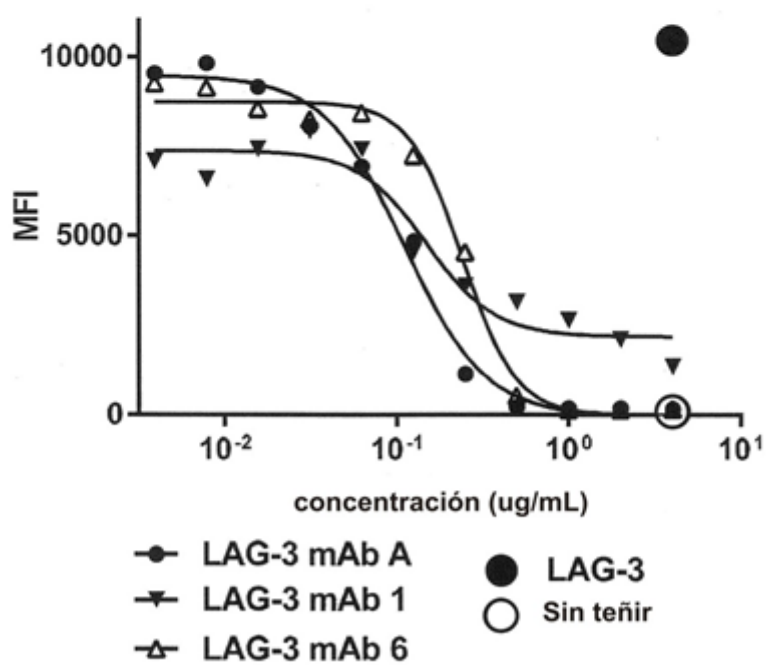
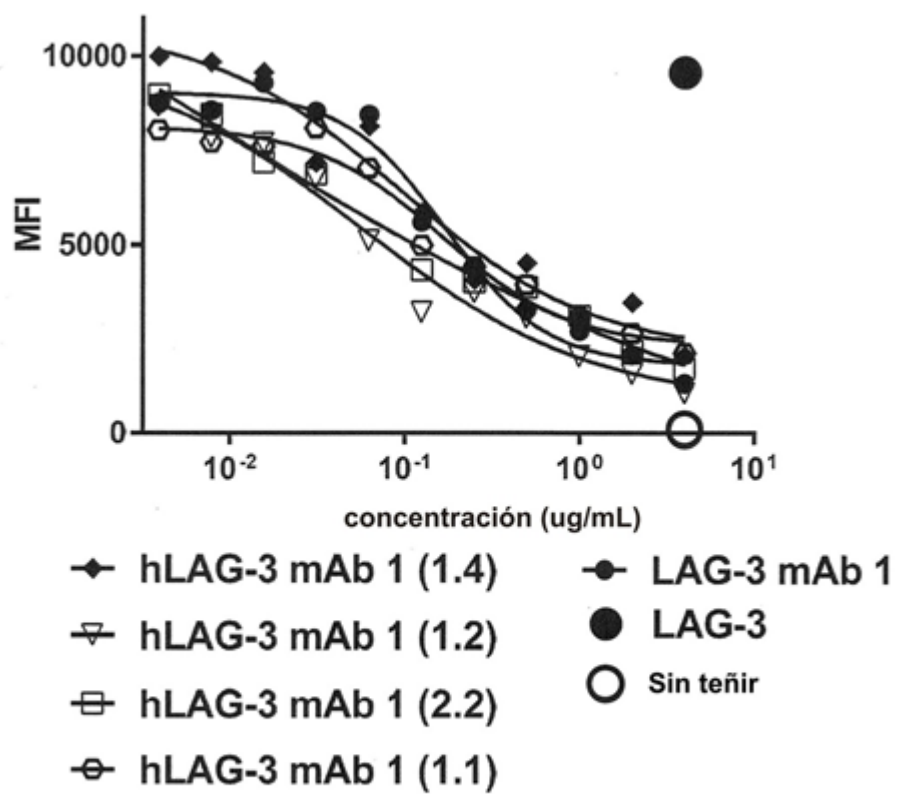


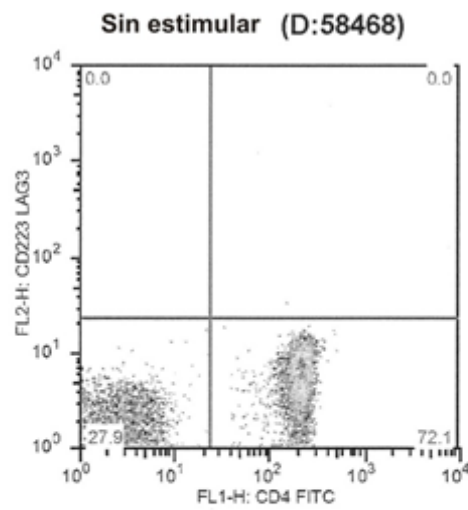
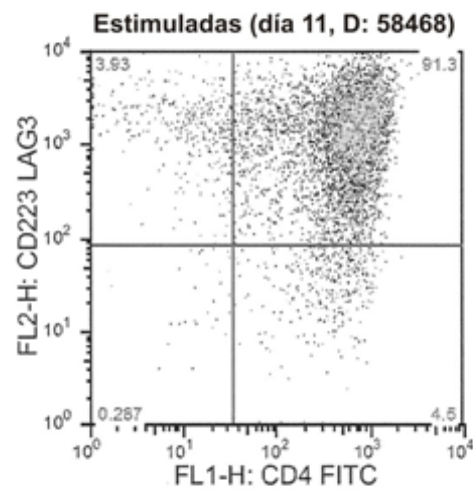
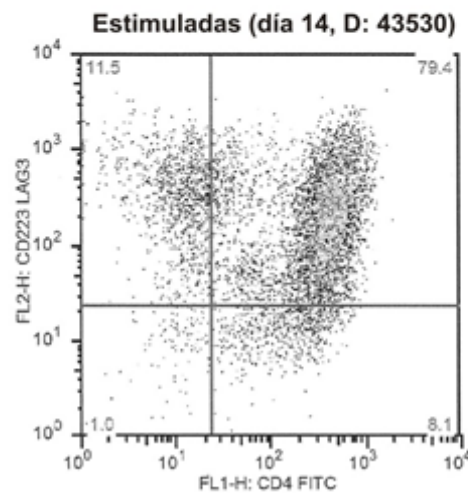
Figura 4B

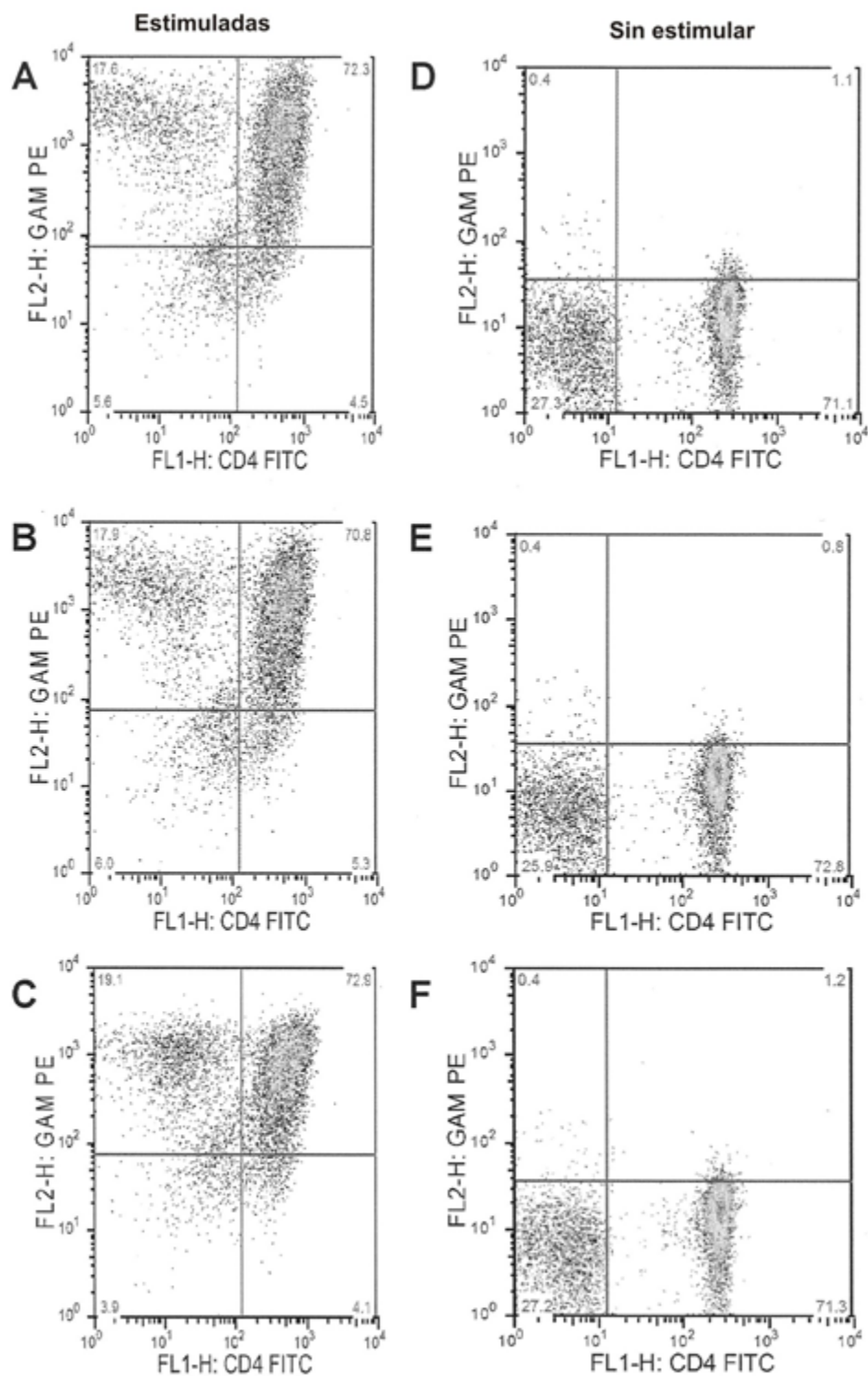
**Figura 5**

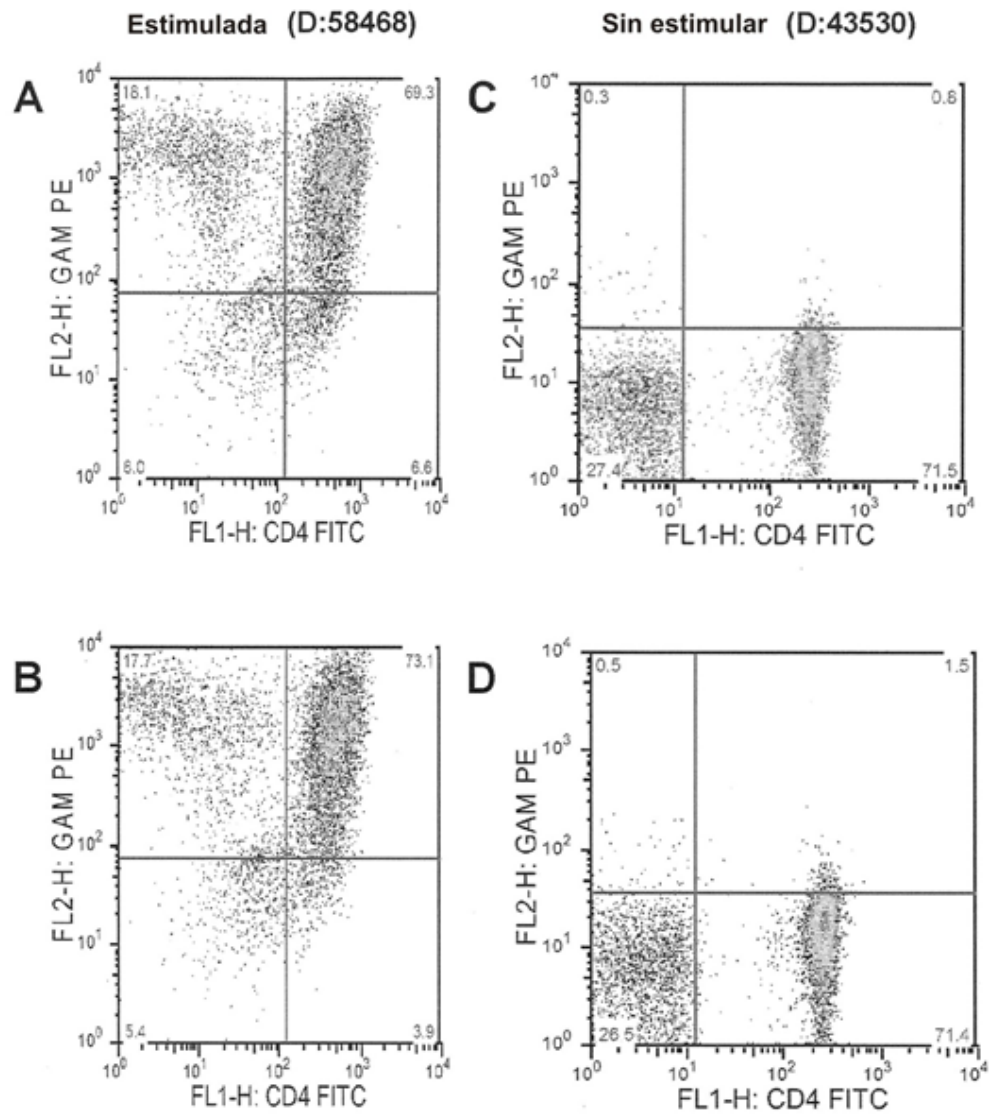
**Figura 6**

**Figura 7A****Figura 7B**

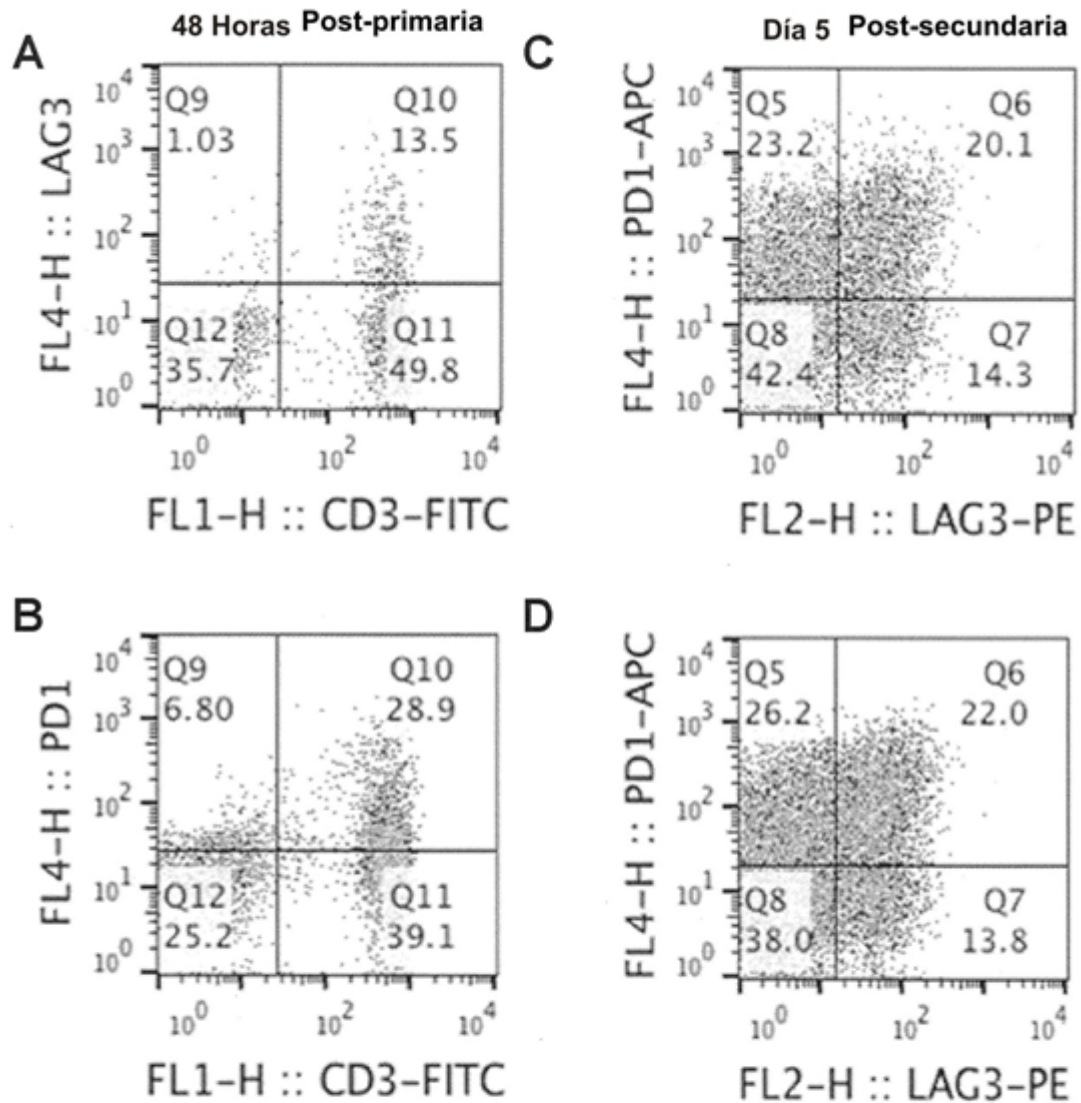
**Figura 7c**

A.**B.****C.****Figura 8**

**Figura 9**

**Figura 10**

D:34765

**Figura 11**

D:53724

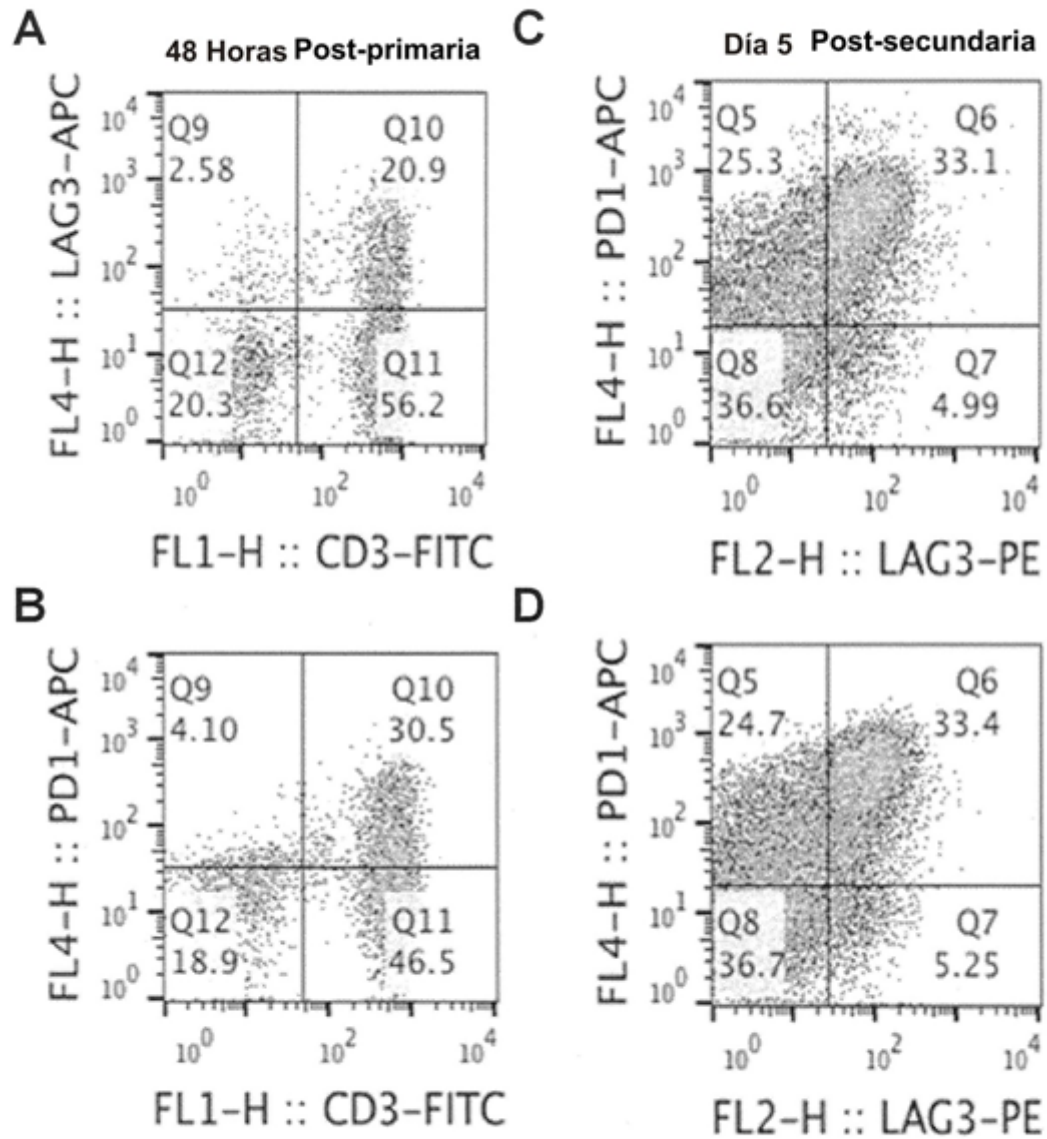
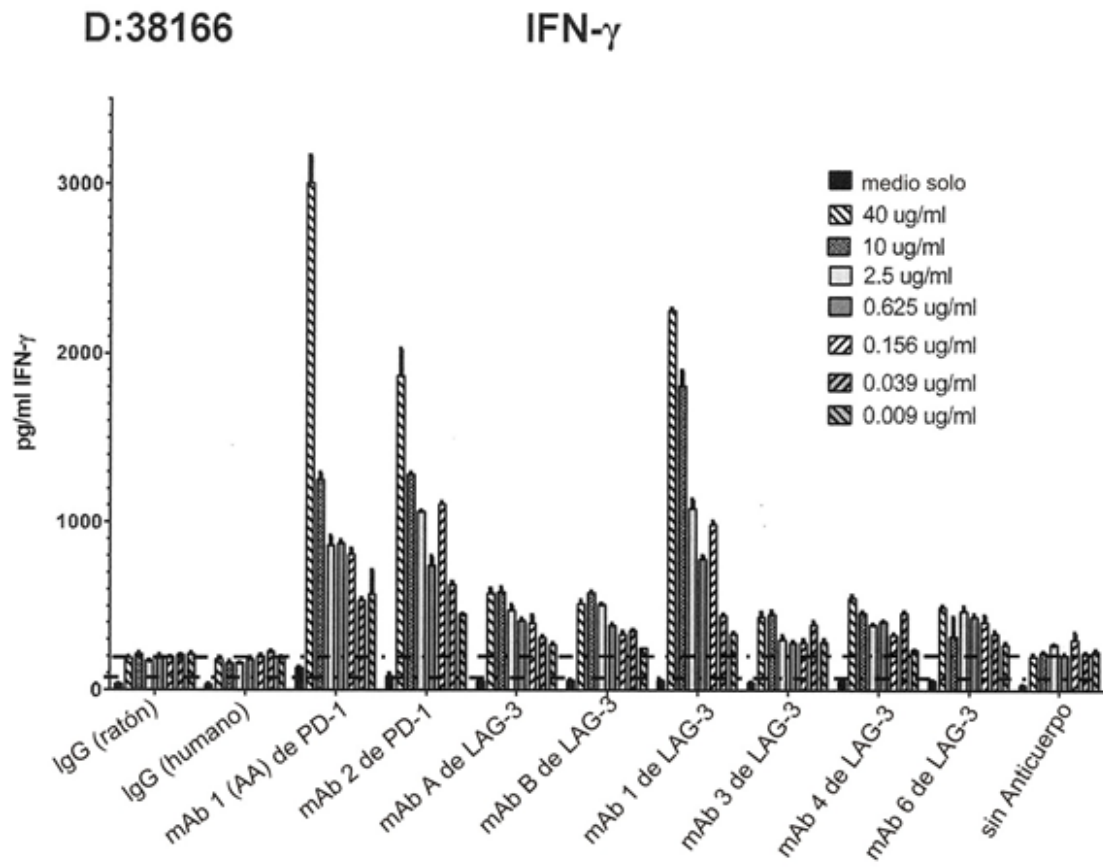
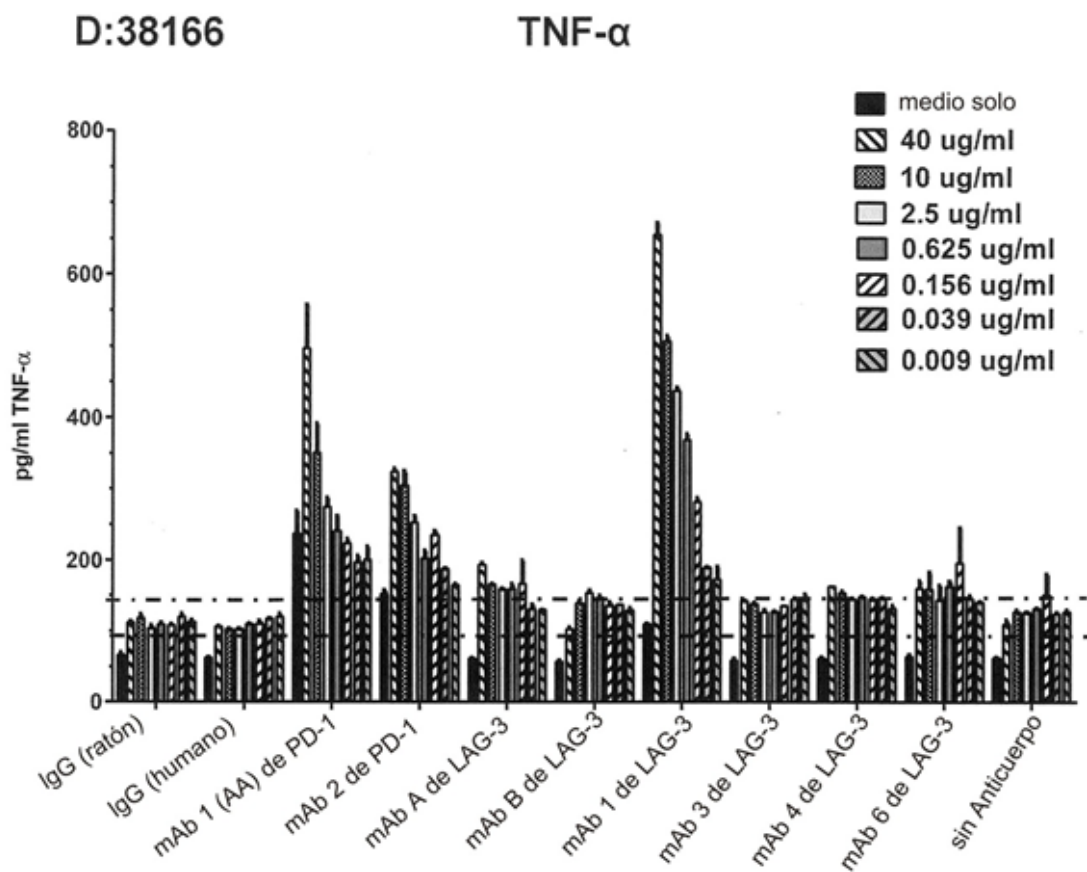
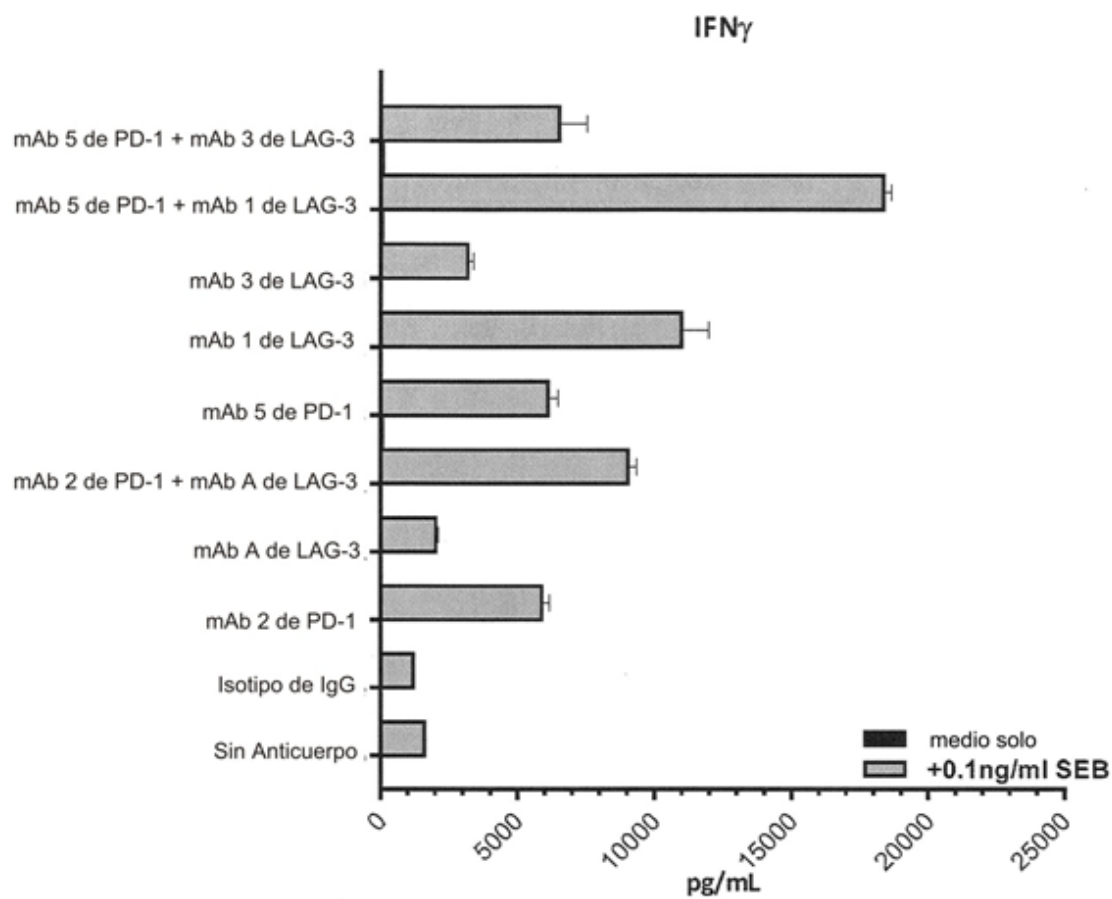


Figura 12

**Figura 13A**

**Figura 13B**

D:58108**Figura 14**

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

La hoja de datos de la solicitud es parte de la solicitud provisional o no provisional para lo cual está siendo presentada. El siguiente formato contiene los datos bibliográficos dispuestos en un formato especificado por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos como es resumido en el 37 CFR 1.76.

Este documento puede ser completado en forma electrónica y presentado a la Oficina en formato electrónico usando el Sistema de Presentación Electrónica (EFS) o el documento puede ser impreso e incluido en una solicitud presentada en papel.

Ordena Secreto 37 CFR 5.2

[] Porciones o todo lo de la solicitud asociado con esta Hoja de Datos de la Solicitud puede caer bajo una Orden de Secreto de acuerdo con el 37 CFR 5.2 (Solo los que presentan en papel. Las solicitudes que caen bajo la Orden de Secreto no pueden ser presentadas en forma electrónica.)

Información del Inventor:

Inventor 1					
Suprimir					
Nombre Legal					
Prefijo	Nombre	Segundo Nombre	Nombre Familiar	Sufijo	
	Leslie	S.	Johnson		
Información de Residencia (Selecione Una) ☒ Residente de EEUU ☐ No Residente de EEUU ☐ Activo en el Servicio Militar de los EEUU					
Ciudad	Darnestown	Estado/Provincia	MD	País de Residencia ⁱ	EEUU
Dirección Postal del Inventor:					
Dirección 1		14411 Poplar Hill Road			
Dirección 2					
Ciudad	Darnestown	Estado/Provincia	MD		
Código Postal	20874	País ⁱ	EEUU		
Inventor 2					
Suprimir					

Nombre Legal					
Prefijo	Nombre	Segundo Nombre	Nombre Familiar	Sufijo	
	Paul	A.	Moore		
Información de Residencia (Selecione Una)		☒ Residente de EEUU	☐ No Residente de EEUU	☐ Activo en el Servicio Militar de los EEUU	
Ciudad	Bethesda	Estado/Provincia	MD	País de Residencia	EEUU
Dirección Postal del Inventor:					
Dirección 1		7013 Old Gate Road			
Dirección 2					
Ciudad	Bethesda	Estado/Provincia	MD		
Código Postal	20852	País ⁱ	EEUU		
Inventor 3 Suprimir					
Nombre Legal					
Prefijo	Nombre	Segundo Nombre	Nombre Familiar	Sufijo	
	Douglas	H.	Smith		
Información de Residencia (Selecione Una)		☒ Residente de EEUU	☐ No Residente de EEUU	☐ Activo en el Servicio Militar de los EEUU	

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLECULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

Ciudad	San Mateo	Estado/Provincia	CA	País de Residencia ⁱ	EEUU
Dirección Postal del Inventor:					
Dirección 1	429 W. Hillsdale Blvd.				
Dirección 2					
Ciudad	San Mateo	Estado/Provincia	CA		
Código Postal	94403	País ⁱ	EEUU		
Inventor 4					
Suprimir					
Nombre Legal					

Prefijo	Nombre	Segundo Nombre	Nombre Familiar	Sufijo
	Ross		La Motte-Mohs	
Información de Residencia (Seleccione Una) ☒ Residente de EEUU ☐ No Residente de EEUU ☐ Activo en el Servicio Militar de los EEUU				
Ciudad	Gaithersburg	Estado/Provincia	MD	País de Residencia i
EEUU				
Dirección Postal del Inventor:				
Dirección 1	11 Teachers Way #4102			
Dirección 2				
Ciudad	Gaithersburg	Estado/Provincia	MD	
Código Postal	20877	País ⁱ	EEUU	
Inventor 2				
Suprimir				
Nombre Legal				
Prefijo	Nombre	Segundo Nombre	Nombre Familiar	Sufijo
	Kalpana		Shah	
Información de Residencia (Seleccione Una) ☒ Residente de EEUU ☐ No Residente de EEUU ☐ Activo en el Servicio Militar de los EEUU				
Ciudad	Boyds	Estado/Provincia	MD	País de Residencia i
EEUU				
Dirección Postal del Inventor:				
Dirección 1	13013 Ethel Rose Way			

Dirección 2			
Ciudad	Boyds	Estado/Provincia	MD
Código Postal	20841	País ⁱ	EEUU
Todos los Inventores Deben Ser Enlistados - Bloques de Información del Inventor adicional pueden ser generados dentro de este formato seleccionando el botón Agregar			
Agregar			

Información de Correspondencia:

Introduzca ya sea el Número de Cliente o complete la sección de Información de Correspondencia abajo. Para información adicional ver 37 CFR 1.33(a).
[] Una dirección está siendo proporcionada para la información de correspondencia de esta solicitud.

EFS Web 2.2.11

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

Número de Cliente	66522	
Dirección de Email	epatent@ipatlw.com	Agregar Email Suprimir Email

Información de la Solicitud:

Título de la Invención	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS		
Número de Caso del Abogado	1301.0121P	Reclama Estado de Pequeña Entidad [X]	
Tipo de Solicitud	Provisional		
Tema Objeto	Utilidad		
Número Total de Hojas de Dibujos (si los hay)	19	Figura Sugerida para Publicación (si la hay)	

Presentación Por Referencia:

Solo complete esta sección cuando la presentación de una solicitud por referencia bajo el 35 U.S.C. 111(c) y 37 CFR 1.57(a). No complete esta sección si los documentos de la solicitud incluyen una especificación y los dibujos están siendo presentados. Cualquier información de beneficio doméstico o prioridad extranjera deben proporcionarse en la(s) sección(es) apropiada(s) siguiente(s) (esto es, "Información de Beneficio Doméstico/Etapa Nacional" e "Información de Prioridad Extranjera").

A efectos de una fecha de presentación bajo el 37 CFR 1.53(b), la descripción y los dibujos de la presente solicitud se sustituyen por esta referencia a la solicitud presentada anteriormente, con sujeción a las condiciones y requerimientos del 37 CFR 1.57(a).

Número de solicitud o de la solicitud presentada previamente	Fecha de Presentación (AAAA-MM-DD)	Autorización de la Propiedad Intelectual o País ⁱ

Información de Publicación:

☐ Solicitud de Publicación Anticipada (Derecho requerido en el momento de la Solicitud 37 CFR 1.219)

Solicitud de No Publicar. Por este medio solicito que la solicitud anexa no sea publicada de acuerdo al 35 U.S.C.

122(b) y certifico que la invención revelada en la solicitud anexa **no ha sido y ni**

[] **será** el tema de una solicitud presentada en otro país, o bajo un convenio internacional multilateral, que requiere la publicación dieciocho meses después de la presentación

Información del Representante:

La información del representante debe ser proporcionada a todos los practicantes que tengan un poder de abogado en la solicitud. El proporcionar esta información en la Hoja de Datos de la Solicitud no constituye un poder de abogado en la solicitud (ver 37 CFR 1.32).

Introduzca ya sea el Número de Cliente o complete la sección del Nombre del Representante abajo. Si ambas secciones son completados el Número de Cliente será usado para la Información del Representante durante el procesamiento.

Favor Seleccione Uno:	☒ Número de Cliente	☐ Practicante de Patente de los EEUU	☐ Reconocimiento limitado (37CFR 11.9)
Número de Cliente:	66522		

EFS Web 2.2.11

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

Información de Beneficio Nacional/ Etapa Nacional:

Esta sección permite al solicitante reclamar ya sea el beneficio de acuerdo al 35 U.S.C. 119(e), 120, 121, o 365(c) o indicar el ingreso a la Etapa Nacional de una solicitud del PCT. Proporcionar esta información en la hoja de datos de la solicitud constituye la referencia específica requerida por el 35 U.S.C. 119(e) o 120, y 37 CFR 1.78.			
Estado de la Solicitud Anterior			Suprimir
Número de	Tipo de	Número de	Fecha de

Solicitud	Continuidad	Solicitud Anterior	Presentación (AAAA-MM-DD)

Los Datos Adicionales del Beneficio Domestico/Etapa Nacional pueden ser generados dentro de este formato seleccionando el botón Agregar.

Información de Prioridad Extranjera:

Esta sección le permite al solicitante reclamar la prioridad para una solicitud extranjera. Proporcionar esta información en la hoja de datos de la solicitud constituye el reclamo de prioridad como es requerido por el 35 U.S.C. 119(b) y 37 CFR 1.55(d). Cuando es reclamada la prioridad para una solicitud extranjera esta es elegible para recuperarla bajo el programa de cambio de documento de prioridad (PDX)ⁱ la información será utilizada por la Oficina para intentar la recuperación en forma automática de acuerdo al 37 CFR 1.55(h)(1) y (2). Bajo el programa PDX, el solicitante lleva el ultimato de la responsabilidad para asegurar que una copia de la solicitud extranjera es recibida por la Oficina de la oficina de la propiedad intelectual extranjera participante, o una copia certificada de la solicitud de prioridad extranjera es presentada, dentro del período especificado en el 37 CFR 1.55(g)(1).

☐			
Número de Solicitud	País ⁱ	Fecha de Presentación (AAAA-MM-DD)	Código de Acceso ⁱ (si es aplicable)
Los Datos Adicionales de la Prioridad Extranjera pueden ser generados dentro de este formato seleccionando el botón Agregar [Agregar]			

Declaración de acuerdo al 37 CFR 1.55 o 1.78 o AIA (Primer Inventor para Presentar) Solicitudes de Transición

Esta solicitud (1) reclama la prioridad para o el beneficio de una solicitud presentada antes del 16 de marzo de 2013 y (2) también contiene, o contuvo en cualquier momento, una [] reivindicación para una invención reclamada que tiene una fecha de presentación efectiva en o después del 16 de marzo de 2013. NOTA: Proporcionando este estatuto bajo el 37 CFR 1.55 o 1.78, esta solicitud. con una fecha de presentación en o después del 16 de marzo de 2013, será examinado bajo el primer inventor de la presentación de provisiones de la AIA.
--

EFS Web 2.2.11

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

Autorización para Permitir Acceso:

[] Autorización para Permitir Acceso a la Presente Solicitud por las Oficinas Participantes
Si es marcado, el suscrito por este medio concede a la USPTO autoridad para proporcionar a la Oficina de Patentes Europea (EPO), a la Oficina de Patentes Japonesa (JPO), a la Oficina de la Propiedad Intelectual Coreana (KIPO), a la Oficina de la Propiedad Intelectual Mundial (WIPO), y cualesquiera otras oficinas de la propiedad intelectual en la cual una solicitud extranjera que reclama la prioridad para la presente solicitud

de patente es presentado el acceso a la presente solicitud de patente. Ver 37 CFR 1.14(c) y (h). Este cuadro no debe ser marcado si el solicitante no desea la EPO, JPO, KIPO, WIPO, u otra oficina de la propiedad intelectual en la cual una solicitud extranjera que reclama la prioridad a la presente solicitud de patente es presentada para tener acceso a la presente solicitud de patente.

De acuerdo con el 37 CFR 1.14(h)(3), el acceso será proporcionado a una copia de la presente solicitud de patente con respecto a: 1) la presente solicitud de patente ya presentada; 2) cualquier solicitud extranjera a la cual la presente solicitud de patente reclama prioridad bajo el 35 U.S.C. 119(a)-(d) si una copia de la solicitud extranjera que satisface el requerimiento de la copia certificada del 37 CFR 1.55 ha sido presentada en la presente solicitud de patente; y 3) cualquier solicitud de los EUA presentada a partir de la cual es solicitado el beneficio en la presente solicitud de patente.

De acuerdo con el 37 CFR 1.14(c), el acceso será proporcionado a la información concerniente a la fecha de presentación de esta Autorización.

Información del Solicitante:

Proporcionar la información de asignaciones en esta sección

no sustituye el cumplimiento de cualquier requisito de la parte 3 del Título 37 del CFR para tener una cesión inscrita en la Oficina.

Solicitante 1

Si el solicitante es el inventor (o el inventor o inventores que permanecen unidos bajo el 37 CFR 1.45), esta sección no debe ser completada. La información que se proporciona en esta sección es el nombre y la dirección del representante legal que es el solicitante en virtud del 37 CFR 1.43; o el nombre y dirección del cesionario, persona a quien el inventor está bajo una obligación para ceder la invención, o persona a quien de otra manera muestra el suficiente interés en la propiedad de la materia que es el solicitante en virtud del 37 CFR 1.46. Si el solicitante es un solicitante en virtud del 37 CFR 1.46 (cesionario, persona a quien el inventor está obligado a ceder, o la persona a quien de otra manera muestra suficiente interés en la propiedad) junto con uno o más inventores conjuntos, entonces el inventor o inventores conjuntos quienes son también los solicitantes deben ser identificados en esta sección.

☐ Cesionario	☐ Representante Legal de acuerdo al 35 U.S.C. 117	☐ Inventor Conjunto
----------------------------------	---	---

☒ Persona a quien el inventor está obligado a ceder.	☐ Persona quien muestra suficiente interés del propietario
Si el solicitante es el representante legal, indique la autoridad para presentar la solicitud de patente, el inventor es:	
Nombre del inventor fallecido o legalmente incapacitado:	
Si el Solicitante es una Organización marque aquí. [x]	
Nombre de la Organización	MacroGenics, Inc.
Información de Dirección Postal del Solicitante:	

EFS Web 2.2.11

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLECULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

Dirección 1		9640 Medical Center Drive	
Dirección 2			
Ciudad	Rockville	Estado/Provincia	MD
País ⁱ	EEUU	Código Postal	20850
Número de Teléfono		Número de Fax	
Dirección de Email			

Los Datos Adicionales del Solicitante pueden ser generados dentro de este formato seleccionando el botón de Agregar

[Agregar]

Información del Cesionario incluyendo la Información del Cesionario No Solicitante:

Proporcionar información de la cesión en esta sección no se substituye para el cumplimiento con cualquier requerimiento de la parte 3 del Título 37 del CFR para tener una cesión registrada por la Oficina.			
Cesionario 1			
Complete esta sección solo si la información del cesionario no solicitante se desea para ser incluida en la publicación de la solicitud de patente de acuerdo con el 37 CFR 1.215(b). No incluir en esa sección una solicitud bajo el 37 CFR 1.46 (cesionario, pero a quien el inventor está obligado a ceder, o persona a quien de otra manera muestra suficiente interés del propietario), como la publicación de la solicitud de patente incluirá el nombre del (de los) solicitante(s).			
Suprimir			
Si el Cesionario o el Cesionario No Solicitante es una Organización marque aquí. [X]			
Nombre de Organización	MacroGenics, Inc.		
Información de Dirección Postal:			
Dirección 1	9640 Medical Center Drive		
Dirección 2			
Ciudad	Rockville	Estado/Provincia	MD

País ⁱ	EE.UU.	Código Postal	20850
Número de Teléfono		Número de Fax	
Dirección de Email			
Datos Adicionales del Cesionario o del Cesionario No Solicitante pueden ser generados dentro de este formato seleccionando el botón Agregar [Agregar]			

Firma:

NOTA: Este formato debe ser firmado de acuerdo con el 37 CFR 1.33. Ver 37 CFR 1.4 para los requerimientos de la firma y certificaciones.			
Firma	/Lisa Kreppel/	Fecha (AAAA-MM-DD)	2015-06-08

EFS Web 2.2.11

PTO/AIA/14 (12-13)
 Aprobada para usarse hasta
 el 30/04/2017, OMB 0651-
 0032 Oficina de Patentes y
 Marcas. de los EE.UU.;
 DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE
 EE.UU.

Según la Ley de Reducción de Trámites de 1995, ninguna persona está obligada a responder a una solicitud de información a menos que muestre un número de control válido de la OMB.

Hoja de Datos de la Solicitud 37 CFR 1.76	Número de Caso del Abogado	1301.0121P
	Número de Solicitud	
Título de la Invención	MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS	

Primer Nombre	Lisa	Apellido	Kreppel	Número de Registro	56970
La Firma Adicional puede ser generada dentro de este formato al seleccionar el botón Agregar. [Agregar]					

Esta recolección de información es requerida por el 37 CFR 1.76. La información es solicitada para obtener o retener un beneficio por el público que es para presentar (y por la USPTO para procesar) una solicitud. Confidencialmente es regida por el 35 U.S.C. 122 y por el 37 CFR 1.14. Esta recolección se estima que toma 23 minutos para completarse, incluyendo la reunión, preparación y presentación del formato de la hoja de datos de la solicitud completado a la USPTO. El tiempo variará dependiendo del caso individual.

Cualesquiera comentarios sobre la cantidad de tiempo que usted necesite para completar este formato y/o sugerencias para reducir esta carga, deben ser enviados al Chief Information Officer, U. S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. NO ENVIE DERECHOS O FORMATOS LLENADOS A ESTA DIRECCION. **ENVIE A: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

EFS Web 2.2.11

Declaración de la Ley de Privacidad

La Ley de Privacidad de 1974 (P.L. 93-579) requiere que le sea dada cierta información con relación a su presentación del formato anexado relacionado con una solicitud de patente o patente. Por consiguiente, de acuerdo con los requerimientos de la Ley, por favor tenga en cuenta que: (1) la autoridad general para la recopilación de esta información es el 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) el suministro de la información solicitada es voluntaria; y (3) el propósito principal para el cual la información es utilizada por la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU es para procesar y/o examinar su presentación relacionada con una solicitud de patente o patente. Si usted no suministra la información requerida, la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU no puede ser capaz de procesar y/o examinar su presentación, lo cual puede dar como resultado el término de los procedimientos o abandono de la solicitud o expiración de la patente.

La información proporcionada por usted en este formato será sometida a los siguientes usos de rutina:

1. La información en este formato será tratada confidencialmente en la medida permitida de acuerdo a la Ley de Libertad de Información (5 U.S.C. 552) y la Ley de Privacidad (5 U.S.C. 552a). Los registros de este

sistema de registros pueden ser revelados al Departamento de Justicia para determinar si la Ley de Libertad de Información requiere la revelación de estos registros.

2. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, en el curso de la presentación de evidencia a una corte, magistrado, o tribunal administrativo, incluida la publicación a los abogados en el curso de negociaciones de los estatutos.
3. Un registro en este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a un Miembro del Congreso presentando una solicitud que involucra a una persona, a quien pertenece el registro, cuando el individuo ha solicitado ayuda del Miembro con respecto al tema objeto del registro.
4. Un registro en este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a un contratista de la Agencia que tiene necesidad de la información a fin de realizar un contrato. Los receptores de información deben ser requeridos para cumplir con los requerimientos de la Ley de Privacidad de 1974, en su versión modificada de acuerdo al 5 U.S.C. 552a(m).
5. Un registro relacionado con una Solicitud Internacional presentada de acuerdo con el Tratado de Cooperación en Patentes en este sistema de registros

puede ser revelado, como un uso de rutina, a la Oficina Internacional de la Organización de la Propiedad Intelectual Mundial, de acuerdo al Tratado de Cooperación en Patentes.

6. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a otra agencia federal para propósitos de revisión de Seguridad Nacional (35 U.S.C. 181) y para revisión de acuerdo a la Ley de Energía Atómica (42, U.S.C. 218(c)).
7. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, al Administrador, Servicios Generales, o su inventor, durante una inspección de registros conducido por GSA como parte de la responsabilidad de la agencia para recomendar mejoras en prácticas y mejoras de manejo de registros, de acuerdo con la autoridad del 44 U.S.C. 2904 y 2906. Dicha revelación debe hacerse de acuerdo con la inspección de gobernación de reglamentos de GSA para este propósito, y cualquier otra directiva relevante (esto es GSA o Comercio). Dicha revelación no debe ser usada para hacer determinaciones acerca de las personas.
8. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, al público después de ya sea la publicación de la solicitud de acuerdo al 35

U.S.C. 122(b) o la emisión de una patente de acuerdo al 35 U.S.C. 151. Además, un registro puede ser revelado, sujeto a las limitaciones del 37 CFR 1.14, como un uso de rutina, para el público si el registro fue presentado en una solicitud que es abandonada, o en la cual los procedimientos fueron terminados y que la solicitud es referenciada por ya sea una solicitud publicada, una solicitud abierta a inspección pública o una patente emitida.

9. Un registro de este sistema de registros puede ser revelado, como un uso de rutina, a una agencia autorizada por la ley local, Federal o Estatal, si la USPTO está consciente de una violación o violación potencial de la ley o reglamento.