

MOLÉCULAS DE UNIÓN A LAG-3**Referencia Cruzada a las Solicitudes Relacionadas:**

[0001] Esta solicitud reclama la prioridad de las
5 Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 62/255,094
(presentada el 13 de noviembre de 2015; pendiente) y
62/172,277 (presentada el 8 de junio de 2015; pendiente),
cada una de cuyas aplicaciones se incorpora en la presente
para referencia en su totalidad.

10

Referencia a la Lista de Secuencias:

[0002] Esta solicitud incluye una o más Listas de Secuencia
de conformidad con 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, las cuales
se describen en el medio legible por computadora (nombre de
15 archivo: 1301_0121PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, creada el
18 de mayo de 2016, y que tiene un tamaño de 105,774 bytes),
cuyo archivo se incorpora en la presente para referencia en
su totalidad.

20 Campo de la Invención:

[0003] La presente invención se dirige a Moléculas de Unión
a LAG-3 que comprenden el dominio de unión de 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
25 , 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 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

[0004] 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).

[0005] 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 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 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 señal sirve para determinar la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta.

[0006] El sistema inmune se encuentra controlado firmemente por ligandos y receptores co-estimuladores y co-inhibidores. Estas moléculas proporcionan la segunda señal para la 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 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 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; 5 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* 10 *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 15 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 20 (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 25 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 necesita la proliferación.

[0007] Investigaciones adicionales en los ligandos del
 5 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.*
 10 *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)
 15 "*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-
 260; Agarwal, A. et al. (2008) "*The Role Of Positive
 Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance*,"
 20 *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Wang, S. et al.
 (2004) "*Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In
 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),
 25 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)
 5 "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).

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

[0008] 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.
 15 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)
 20 "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis," J. Immunol. 182(4):1885-1891).

[0009] 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
 25 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).

[0010] 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-
 5 695; 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
 10 Antigenic Response Of CD4+ T Lymphocytes," Eur. J. Immunol.
 24:3216-3221).

[0011] 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
 15 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
 20 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-
 25 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*
5 *Activation in vivo,*" J. Immunol. 172:5450-5455).

[0012] 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
10 patógenos, especialmente a concentraciones terapéuticas más 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
15 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
20 LAG3 potentes. En particular, existe una necesidad por moléculas de unión a LAG-3 que en un perfil cinético de unión deseable , unan diferentes epítopos LAG-3 y/o exhiban actividad de agente único que podría suministrar valor terapéutico a pacientes que sufren de cáncer u otras
25 enfermedades y padecimientos. La presente invención se dirige

a estos y otros objetivos.

Compendio de la Invención:

[0013] La presente invención se dirige a Moléculas de Unión
5 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
10 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
15 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
20 también pertenece a métodos que usan tales moléculas de unión a LAG-3 para detectar LAG-3 o para estimular una respuesta 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
25 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.

5 **[0014]** En detalle, la invención suministra una molécula de unión a LAG-3 que es capaz de unir tanto a LAG-3 humano como 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,
10 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:8, SEQ ID NO:9, y SEQ ID NO:10;** y

15 (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:13, SEQ ID NO:14, y SEQ ID NO:15;**

o

20 (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 1 de hLAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, y SEQ ID NO:10;** y

(2) el Dominio de CDR_L1 , el Dominio de CDR_L2, y el
25 Dominio de CDR_L3 son las CDR de Cadena Ligera de mAb 1 de

hLAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:14, y SEQ ID NO:15;**

o

(C) (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 LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, y SEQ ID NO:33;** 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:36, SEQ ID NO:37, y SEQ ID NO:38;**

o

(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 3 de LAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, y SEQ ID NO:43;** 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 3 de LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:48;**

o

(E) (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:51, SEQ ID NO:52, y SEQ ID NO:53;** 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 4 de LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, y SEQ ID NO:58;**

5 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 5 de LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, y SEQ ID NO:63;** y

10 (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 LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, y SEQ ID NO:68;**

o

15 (G) (1) el Dominio de CDR_{H1} , el Dominio de CDR_{H2}, y el Dominio de CDR_{H3} son las CDR de Cadena Pesada de VH1 de mAb 6 de LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, y SEQ ID NO:73;** y

20 (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 6 de LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78;**

o

25 (H) (1) el Dominio de _{H1} , el Dominio de CDR_{H2}, y el Dominio de CDR_{H3} son las CDR de Cadena Pesada de hAb 6 de

LAG-3 , y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, y SEQ ID NO:73;** 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 hAb 6 de hLAG-3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78.**

[0015] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde el Dominio Variable de Cadena Pesada tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:49, o SEQ ID NO:59.**

[0016] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde el Dominio Variable de Cadena Ligera tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:54, o SEQ ID NO:64.**

[0017] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde el Dominio Variable de Cadena Pesada tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:79, o SEQ ID NO:80.**

[0018] La invención se refiere además a las modalidades de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde el Dominio Variable de Cadena Ligera tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:83, o SEQ ID NO:85.**

[0019] La invención se refiere además a las modalidades de todas esas moléculas de unión a LAG-3 en donde la molécula es un anticuerpo, y especialmente en donde la molécula es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

5 **[0020]** La invención se refiere además a la modalidad en donde la molécula de unión a LAG-3 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
10 molécula involucrada en la 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,
15 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, y de mayor preferencia en donde el segundo epítipo es un epítipo de CD137, OX40, PD-1, TIGIT o TIM-3).

20 **[0021]** La invención se refiere además a la modalidad de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde la molécula es un diacuerpo, y especialmente, en donde el diacuerpo es un complejo de unión covalente que comprende dos, o tres, o cuatro, o cinco, o más de cinco moléculas de cadenas de
25 polipéptidos. La invención se refiere además a la modalidad

de tales moléculas de unión anti-LAG-3 en donde la molécula es una molécula de unión trivalente, siendo la molécula de unión trivalente es un complejo de unión covalente que comprende tres, cuatro, cinco o más cadenas de polipéptidos.

5 La invención se refiere de forma adicional a la modalidad de tales moléculas de unión a LAG-3 en la cual 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 en la que la molécula comprende un Dominio de Unión de
10 Albúmina, y especialmente un Dominio de Unión de Albúmina desinmunizado.

[0022] La invención se refiere además a las modalidades de todas de tales moléculas de unión a LAG-3 en donde la molécula comprende una Región de Fc Fracción Cristalizable), y en donde
15 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 y/o mejora la vida media del suero, y más particularmente, en donde las modificaciones comprenden por lo menos una sustitución
20 seleccionada de un aminoácido del grupo que consiste de:

(1) L234A;

(2) L235A;

(3) L234A y L235A;

(4) M252Y; M252Y y S254T;

25 (5) M252Y y T256E;

(6) M252Y, S254T y T256E; o

(7) K288D y H435K;

en donde la numeración es la del índice de la UE de acuerdo con Kabat.

5 **[0023]** 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
10 moléculas de unión a LAG-3 previamente descritas se usa en el tratamiento de un trastorno o padecimiento asociado con un sistema inmune suprimido, especialmente cáncer o una infección.

15 **[0024]** La invención particularmente se refiere a tal uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico de cáncer, en donde 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,
20 cáncer de vejiga, cáncer óseo, un cáncer de cerebro y médula 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,
25 un cáncer colorectal, un histiocitoma fibroso benigno

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
5 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
10 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,
15 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
20 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.

25 **[0025]** 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
 5 Hodgkin, cáncer de pulmón no de células pequeñas, cáncer ovárico, cáncer pancreático, un 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, linfoma de Burkitt.

[0026] La invención se refiere además a las modalidades en
 15 las que cualquiera de las moléculas de unión a LAG-3 previamente descritas se marca de manera detectable y se usa en la detección de LAG-3.

Breve Descripción de los Dibujos:

20 **[0027]** **La Figura 1** proporciona un esquema de un diacuerpo unido de forma covalente representativo que tiene dos sitios 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
 25 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 o de trama.

[0028] **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 o de trama.

[0029] **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. Los Dominios VL y VH que
reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón
de sombreado o de trama. Los dos pares de cadenas de
20 polipéptidos pueden ser la misma. En tales modalidades en
donde los Dominios VL y VH reconocen diferentes epítopos (como
se muestra en las **Figuras 3A-3C**) la molécula resultante posee
cuatro sitios de unión de epítipo y es biespecífica y
bivalente con respecto a cada epítipo unido. En tales
25 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
5 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 posee cuatro sitios de unión de epítopo y es biespecífica y bivalente con
10 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.

[0030] Las **Figuras 4A y 4B** proporcionan esquemas de una
20 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 forman toda o parte de una Región de Fc. Las cadenas de
25 polipéptidos que 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 o de trama.

[0031] **La Figura 5** proporciona el esquema de una molécula de diacuerpo covalentemente unida representativa que tiene cuatro sitios de unión a epítipo compuestos por cinco cadenas de polipéptidos. Dos de las cadenas de polipéptidos poseen un Dominio CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas forman una Región de Fc que comprende toda o parte de una Región de Fc. Las cadenas de polipéptidos que comprenden los Dominios VL y VH enlazados 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 o de trama.

[0032] Las **Figuras 6A-6F** proporcionan esquemas de moléculas de unión trivalentes que contiene la Región de Fc representativa que tiene tres sitios de unión a epítopos. Las **Figuras 6A y 6B**, respectivamente ilustran de forma esquemática los dominios de las moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión tipo diacuerpo y un dominio de unión tipo Fab que tiene diferentes orientaciones de dominio en las que los dominios de unión de tipo diacuerpo son terminales N o terminales C para una Región de Fc. Las moléculas en las **Figuras 6A y 6B** comprenden cuatro cadenas. Las **Figuras 6C y 6D**, ilustran respectivamente de

forma esquemática los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo N-terminales para una Región de Fc, y un dominio de unión de tipo Fab en los cuales la cadena ligera y la
 5 cadena pesada se enlazan mediante un péptido conector separador, o un dominio de unión de tipo scFv. Las moléculas de unión trivalentes en las **Figuras 6E y 6F**, ilustran respectivamente de forma esquemática los dominios de moléculas de unión trivalente que comprenden dos dominios de
 10 unión de tipo diacuerpo C-terminales a una Región de Fc, y un dominio de unión de tipo Fab enlazado, o un dominio de unión de tipo scFv en el que se encuentran los dominios de unión de tipo diacuerpo. Las moléculas de unión trivalentes en las **Figuras 6C-6F** que comprenden tres cadenas. Los dominios
 15 VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o de trama.

[0033] Las **Figuras 7A-7C** muestran las características de unión de mAb 1 de LAG 3 y mAb 6 de LAG-3 para LAG-3 de monocynomolgous. Curvas de unión Biacore de mAb 6 (1.1) de hLAG-3
 20 (**Figura 7A**), mAb 1 (1.4) de hLAG-3 (**Figura 7B**) y mAb A de hLAG-3(**Figura 7C**) que demuestran que mAb 6 (1.1) de hLAG-3 exhibe una mejor unión a LAG-3 de monocynomolgous (RU; Unidades de Respuesta).

[0034] Las **Figuras 8A-8C** muestra que mAb 1 de LAG 3 y mAb 6
 25 de LAG-3 unen un epítipo que es distinto del que se une por

el anticuerpo de referencia mAb A de LAG 3, los perfiles de unión de los mAb 1 de LAG 3, mAb 6 de hLAG-3 y mAb A de hLAG-3 etiquetados, en la ausencia de un anticuerpo competidor (**Figura 8A**), en presencia de mAb 1 de hLAG-3 en
 5 exceso (**Figura 8B**), de mAb 6 de hLAG-3 en exceso (**Figura 8C**), o mAb A de hLAG-3 (**Figura 8D**) (RU; Unidades de Respuesta).

[0035] Las **Figuras 9A-9B** muestran que los anticuerpos aislados inhiben la unión de LAG-3 humano soluble (shLAG-3) con MHC clase II como se determina en una prueba de ELISA.
 10 La **Figura 9A** muestra las curvas de inhibición de mAb 1 de LAG 3, mAb 2 de LAG 3, mAb 3 de hLAG-3, mAb 4 de hLAG-3, y mAb 5 de LAG-3. La **Figura 9B** muestra las curvas de inhibición de mAb A de LAG-3, hLAG-3 1 (1.4) humanizado , y hLAG-3 6 (1.1) (RLU; Unidades Relativas de Luminiscencia).

15 [0036] Las **Figuras 10A-10C** muestran que los anticuerpos aislados inhiben la unión de shLAG-3 a la superficie de MHC clase II que expresan células Daudi. La **Figura 10A** 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
 20 anticuerpo de referencia mAb A de LAG-3. La **Figura 10B** muestra las curvas de inhibición de mAb 1 de LAG 3, mAb 6 de hLAG-3 y mAb A de hLAG-3. La **Figura 10C** muestra las curvas de inhibición de mAb 1 de LAG 3 y hLAG-3 1 (1.4) humanizado, hLAG-3 1 (1.2), hLAG-3 1 (2.2), hLAG-3 1 (1.1). Cada figura
 25 representa un experimento separado; MFI, significa intensidad

de fluorescencia.

[0037] Las **Figuras 11A-11C** muestran que la expresión de LAG-3 se sobre-regula en células T CD4+ estimuladas. El análisis por citometría de flujo de la expresión de LAG-3 en células T CD4+ intactas (**Figura 11A**) y células T CD4+ estimuladas por cuentas CD3/CD28 de dos donadores diferentes (**Figuras 11B y 11C**) en el día 11 y 14, respectivamente. Todas las células fueron teñidas junto con el anticuerpo anti-CD4.

[0038] La **Figura 12 (Paneles A-F)** muestra que los anticuerpos aislados anti-LAG-3 se unen a células T estimuladas pero no a intactas. El análisis por citometría de flujo de células T CD 4+ estimuladas CD3/CD28 (**Paneles A-C**) y células T CD4+ intactas (**Paneles D-F**) etiquetadas con mAb 1 de LAG 3 (**Paneles A y D**), mAb 2 de LAG 3 (**Paneles B y E**), o mAb 3 de hLAG-3 (**Paneles C y F**). Todas las células fueron teñidas junto con el anticuerpo anti-CD4.

[0039] La **Figura 13 (Paneles A-D)** muestra que los anticuerpos anti-LAG-3 aislados se unen a células T estimuladas pero no a intactas. El análisis por citometría de flujo de células T CD4+ estimuladas CD3/CD28 (**Paneles A-B**) y células T CD4+ intactas (**Paneles C-D**) etiquetadas con mAb 4 de LAG-3(**Paneles A y C**), o mAb 5 de LAG-3 (**Paneles B y D**). Todas las células fueron teñidas junto con el anticuerpo anti-CD4.

[0040] La **Figura 14 (Paneles A-D)** muestra que la expresión

de LAG-3 y PD-1 se sobre-regula en células mononucleares de sangre periféricas (las PBMC) (SEB)-estimuladas con antígeno de tipo B de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* a partir de un donador representativo D:34765. El análisis por
5 citometría de flujo de las PBMC estimuladas por SEB de un donador representativo 48 horas después de la estimulación primaria (**Paneles A-B**) etiquetadas con anticuerpos anti-LAG-3/anti-CD3 (**Panel A**), o anticuerpos anti-PD-1/anti-CD3 (**Panel B**) y en el día cinco después de la estimulación SEB (**Paneles**
10 **C-D**) células tratadas sólo por SEB (**Panel C**) o con anticuerpo de control isotipo (**Panel D**) durante la estimulación secundaria, marcados con anticuerpos anti-LAG-3/anti-PD-1.

[0041] La Figura 15 (**Paneles A-D**) muestra que la expresión de LAG-3 y PD-1 se sobre-regula en las PBMC estimuladas por
15 SEB de otro donador representativo D:53724. El análisis por citometría de flujo de las PBMC estimuladas por SEB de un donador representativo 48 horas después de la estimulación primaria (**Paneles A-B**) etiquetadas con anticuerpos anti-LAG-3/anti-CD3 (**Panel A**), o anticuerpos anti-PD-1/anti-CD3 (**Panel**
20 **B**) y en el día cinco posterior a la estimulación por SEB (**Paneles C-D**) células tratadas sólo por SEB (**Panel C**) o con anticuerpo de control de isotipo (**Panel D**) etiquetadas con anticuerpos anti-LAG-3/anti-PD-1.

[0042] Las Figuras 16A-16B muestran que mAb 1 de LAG-3 se
25 puede estimular con producción de citocina a niveles

comparables con el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1. Los perfiles de secreción IFN γ (**Figura 16A**) y TNF α (**Figura 16B**), de PBMCs estimuladas por SEB tratadas con anticuerpos anti-LAG-3 o anti-PD-1.

5 **[0043]** La **Figura 17** muestra que mAb de LAG-3 1 es capaz de estimular la producción de citocina a niveles comparables con el tratamiento de anticuerpos anti-PD-1 y que el tratamiento con mAb 1 de LAG-3 en combinación con un anti-PD-1 proporcionó la más grande mejora de liberación de citocina. Los perfiles
10 de secreción de IFN γ de las PBMC estimuladas por SEB tratadas con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-1 solos y en combinación.

[0044] Las **Figuras 18A-18B** muestran la unión entre mAb 6 (1.1) de hLAG-3 para anticuerpos anti-LAG-3, y mAb A de LAG-3
15 para LAG-3 endógeno expresado en las PBMC de mono cynomolgus estimuladas por SEB de dos donadores (**Figuras 18A y 18B**). El mAb A de PD-1 del anticuerpo anti-PD-1 se incluyó como un control positivo para estimulación por SEB.

20 **Descripción Detallada de la Invención:**

[0045] 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
25 , 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 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.

I. Anticuerpos y sus dominios de Unión

[0046] Los anticuerpos de la presente invención son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse

inmunoespecíficamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleotido, lípido, polipéptido, etc., a través de por lo menos un sitio de reconocimiento de epítopo, localizado en el Dominio Variable de la molécula de
5 inmunoglobulina.

[0047] Como se utiliza en la presente, el término "**anticuerpo**" se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse inmunoespecíficamente a un polipéptido o proteína o a una molécula no proteica debido a la presencia
10 en tal molécula de un dominio particular o fracción o conformación (un "**epítopo**"). Una molécula que contiene un epítopo puede tener actividad inmunogénica, de modo que provoque una respuesta de producción de anticuerpos en un animal; tales moléculas se llaman "**antígenos**"). Las moléculas
15 que contienen un epítopo no necesariamente son inmunogénicas.

[0048] Los dominios de unión de la presente invención se unen a epítopos en una manera "**inmunoespecífica**". Como se utiliza en la presente, un anticuerpo, diacuerpo u otra molécula de unión a epítopo se dice que une
20 "**inmunoespecíficamente**" (o que exhibe una unión "**específica**" con) una región de otra molécula (es decir., un epítopo) si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápido, con mayor duración y/o con mayor afinidad con aquél epítopo relativo para epítopos alternativos. Por ejemplo, un
25 anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de LAG-3

es un anticuerpo que se une con tal epítopo de LAG-3 con mayor afinidad, avidez, más rápido, y/o con mayor duración que si se uniera a otro epítopo de LAG-3 o con un epítopo no de LAG-3. También se entenderá al leer esta definición que,
 5 por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítopo) que se une inmuno-específicamente a un primer objetivo puede o no unirse de forma específica o preferencial a un segundo objetivo. Como tal "unión inmuno-específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. De forma general,
 10 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
 15 para unirse inmuno-específicamente con un epítopo puede determinarse a través de, por ejemplo, un inmunoensayo.

[0049] 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
 20 contiene un Dominio Variable (**VH**), tres Dominios Constantes (**CH1**, **CH2** y **CH3**), y un Dominio "**Bisagra**" ("**H**") localizado entre los Dominios **CH1** y **CH2**. La unión estructural básica de inmunoglobulinas de origen natural (*por ejemplo*, IgG) es de
 25 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
5 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
10 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). La capacidad de un anticuerpo para unir un
15 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 de sus Dominios VL y VH forma una de los dos sitios de unión
20 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). Los Dominios Variables de una molécula IgG
25 consisten de regiones determinantes de complementariedad

(**CDR**), que contienen los residuos en contacto con epítopo, 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

5 ciertos residuos de estructura pueden también contactar antígeno). De esta manera, los Dominios V_L y V_H tiene la estructura $n\text{-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c}$. Los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de un anticuerpo de Cadena Ligera se

10 designan en la presente respectivamente como **Dominio CDR_L1**, **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**,

15 **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 epítopo específico a pesar de si tal

20 proteína es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas 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. Por consiguiente, como se utiliza en la presente, el término "**Dominio de Unión a Epítopo**" se refiere a aquella

25 porción de una molécula de unión a epítopo que es responsable

de la capacidad de tal molécula para unirse inmunoespecíficamente a un epítipo. Un fragmento de unión a epítipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 Dominios CDR de tal anticuerpo y, aunque sea capaz de unirse

5 inmunoespecíficamente a ese epítipo, puede exhibir una inmunoespecificidad, afinidad o selectividad hacia tal epítipo que difiere de la del anticuerpo. De preferencia, sin embargo, un fragmento de unión a epítipo contendrá los 6 Dominios CDR de tal anticuerpo. Un fragmento de unión a

10 epítipo de un anticuerpo puede ser una sola cadena de polipéptido (*por ejemplo*, una scFv), o puede comprender dos o más cadenas de polipéptidos, cada una con un término amino y un término carboxilo (*por ejemplo*, un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, etc.).

15 **[0050]** Como se utiliza en la presente, el término “**anticuerpo**” abarca anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camélidos, Fvs (scFv)

20 de una sola cadena, anticuerpos de una sola cadena, fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos (*por ejemplo*, fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a un epítipo, *por ejemplo*, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos que contienen un dominio V_L y/o V_H ,

25 o que contienen 1, 2, o 3 de las regiones determinantes de

complementariedad (las CDR) de tal Dominio VL (*es decir*, CDR_{L1}, CDR_{L2}, y/o CDR_{L3}) o Dominio VH (*es decir*, CDR_{H1}, CDR_{H2}, y/o CDR_{H3})) que se unen específicamente a un antígeno, *etc.*, anticuerpos bifuncionales o multifuncionales, Fvs

5 biespecíficos enlazados por disulfuro (sdFv), intracuerpos y diacuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, se pretende que el término "anticuerpo" abarque moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de

10 inmunoglobulina, *es decir*, moléculas que contienen un lugar de unión a epítipo. 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 (véase, *por ejemplo*, Publicación de los

15 Estados Unidos Nos.: 20040185045; 20050037000; 20050064514; 20050215767; 20070004909; 20070036799; 20070077246; y 20070244303). 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

20 de medicamentos biotecnológicos derivados (Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious 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.

25 **[0051]** Los anticuerpos anti-LAG-3 de la presente invención

incluyen variantes de anticuerpos humanizados, quiméricos o caninizados mAb 1 de LAG-3, mAb 2 de LAG-3, mAb 3 de LAG-3, mAb 4 de LAG-3, mAb 5 LAG-3, o mAb 6 de LAG-3.

[0052] El término "**anticuerpo quimérico**" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a un anticuerpo de una especie (*por ejemplo, ratón*) o clase de anticuerpo o subclase, mientras la porción remanente es idéntica u homóloga a un anticuerpo de otra especie (*por ejemplo, humano*) o clase o subclase de anticuerpo, mientras que exhiban la actividad biológica deseada. Anticuerpos quiméricos de interés que se encuentran en la presente incluyen anticuerpos "**primatizados**" que comprenden secuencias de unión de dominio variable derivadas de un primate no humano (*por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.*) y secuencias humanas de región constante.

[0053] El término "**anticuerpo monoclonal**" como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por anticuerpos posibles que poseen mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores, y el término "**anticuerpo policlonal**" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos heterogéneos. El término "monoclonal" indica el carácter del

anticuerpo como una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular (por ejemplo, por hibridoma, selección del fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El 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*," 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 celulares, o preparados protéicos 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
5 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
10 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 inmunoespecíficos para un epítopo
15 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
20 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 mono específicas o multiespecíficas
25 (*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.

5 **[0054]** El término "**scFv**" se refiere a fragmentos de una sola cadena de Dominio Variable. Las moléculas scFv se hacen por la unión de un Dominio Variable de Cadena Ligera y/o Pesada utilizando un péptido corto de unión. Bird et al. (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science
10 242:423-426) 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 utilizado conectores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding*
15 *Proteins*," Science 242:423-426). 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
20 usar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, se puede introducir un plásmido adecuado que contiene polinucleótido y codifica el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, tal como células de levadura, planta, insectos o mamíferos, o
25 procariota, tal como E. coli. Se pueden elaborar

Polinucleótidos que codifican el scFv de interés por manipulaciones rutinarias tales como ligación de polinucléotidos. El scFv resultante se puede aislar usando técnicas estándar de purificación de proteína conocidas en la técnica.

[0055] 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 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. El sitio de unión de epítipo puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o sólo las CDR injertadas en regiones de estructura apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión de epítopos 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 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 las regiones
 5 variables tanto de cadenas pesadas como ligeras contienen
 tres CDR que pueden variar en respuesta a los antígenos en
 cuestión y determinar la 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 CDR. 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
 25 Conformation,"* Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et

al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185;

5 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 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

10 Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. *et al.* (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. En algunas modalidades, anticuerpos

15 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, anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que se alteran en sus secuencias de aminoácidos

20 relativas al anticuerpo original, las que también se denominan como una o más CDR "**derivadas de**" una o más CDR del anticuerpo original (es decir, derivadas de tales CDR, derivadas del conocimiento de las secuencias de aminoácidos de tales CDR, etc.). Se puede usar una secuencia de

25 polinucléotido que codifica el dominio variable 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 remanente no humano del anticuerpo por secuencias de anticuerpo humano. Existen cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar el nucléotido 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 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.

[0056] El sitio de unión de epítipo de las moléculas de la presente invención pueden comprender un Dominio Variable completo fusionado a un Dominio Constante o solo las regiones determinantes de complementariedad (las CDR) de tal Dominio Variable injertadas a regiones de estructura apropiadas.. Los sitios de unión de epítopos 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 el dominio variable extraño. (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 solo en proporcionar regiones humano-derivadas constantes, sino también en modificar los dominios variables de modo que se remodelen lo más parecido posible a la forma humana. Se conoce que los dominios variables tanto de cadenas pesadas como ligeras contienen tres regiones determinantes de complementariedad (las CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones de estructura (las FR) que se conservan relativamente en una especie dada y que putativamente proporcionan un andamio para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, los dominios variables pueden ser "remodelados" o "humanizados" al injertar las CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano a ser modificado. La aplicación de esta aproximación a varios anticuerpos se ha reportado por Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for 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
5 *4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped*
Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human
Antibodies Hybridoma 2:124-134; 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)
10 *"Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human*
Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,"
Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized
Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci.
(U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization
15 *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 Humanized Antibodies With Specificity
For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. En algunas
modalidades, anticuerpos humanizados conservan todas las
20 *secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de*
ratón que contiene las 6 CDR de los anticuerpos de ratón).
En otras modalidades, los anticuerpos humanizados tienen uno
o más CDR (uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que difieren
en la secuencia relativa con el anticuerpo original
25 **[0057]** 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
 5 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.
 10 (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
 15 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
 20 Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, 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
 25 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 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 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. 19:2471-2476 y en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; y 5,866,692.

15

II. Receptores Fcγ (FcγRs)

[0058] Los Dominios CH2 y CH3 de las dos cadenas pesadas 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 (**FcγRs**). 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:1):

25	231	240	250	260	270	280
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD
	290	300	310	320	330
	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA
	340	350	360	370	380
5	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE
	390	400	410	420	430
	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE
	440	447			
	ALHNHYTQKS	LSLSPG	X		

10 Según se numera por el Índice de la Unión Europea de acuerdo con Kabat, donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

[0059] La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG2 humana ejemplar es (**SEQ ID NO:2**) :

	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	
	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	
20	390	400	410	420	430	
	WESNGQPENN	YKTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
	440	447				
	ALHNHYTQKS	LSLSPG	X			

Según se numera por el Índice de la Unión Europea de acuerdo
 25 con Kabat, donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

[0060] La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG3 humana ejemplar es (**SEQ ID NO:3**) :

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

Según se numera por el Índice de la Unión Europea de acuerdo con Kabat, donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

15 **[0061]** La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG4 humana ejemplar es (**SEQ ID NO:4**) :

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	YKTTPPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE
25	440	447			

ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

Según se numera por el Índice de la Unión Europea de acuerdo con Kabat, donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

[0062] A través de la presente especificación, la numeración de los residuos en la región constante de una
 5 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
 10 presente 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
 25 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.

[0063] 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.

[0064] 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
5 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
10 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 une complejos IgG en una manera imperceptible. La presencia de un ITIM en el
15 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),
20 que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como una consecuencia de la activación de tirosina 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
25 ligación FcγR e inhibe la sensibilidad celular. De esta manera

se aborta la activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos.

III. Anticuerpos Biespecíficos, Diacuerpos Multiespecíficos y diacuerpos DART®

5 [0065] 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 epítomo y/o antígeno.

[0066] Para proporcionar moléculas que tengan mayor capacidad que los anticuerpos naturales, se ha desarrollado
15 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
20 para fusionar un fragmento adicional de unión de epítomo (*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 epítomo (*por ejemplo*, dos fragmentos Fab o scFvs). Formatos alternativos utilizan
25 péptidos conectores para fusionar un fragmento de unión de

epítopo (*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

5 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

10 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

15 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 comprende un dominio de unión. El documento menciona que

20 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 Dominios VL y VH adicionales, de modo que formen moléculas

25 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 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 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.

[0067] 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

epítopo 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 (Holliger 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 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 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-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res.

69(12):4941-4944).

[0068] 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
5 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
10 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 un célula huésped, ya sea eucariota, tal como células de
15 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
20 conocidas en la técnica.

[0069] 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
25 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 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).

15 **[0070]** La bioespecificidad de diacuerpos ha llevado a su 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-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

25 biespecíficos para coligar receptores en la superficie de

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,*
 5 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
 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-
 10 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), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2
 15 (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 sitios de unión de epítomos dirigidos a una
 20 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 inhibitoria de moléculas de punto de control
 25 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, 5 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, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 y/o VISTA.

[0071] Sin embargo, las ventajas anteriores traen consigo costos considerables. La formación de tales diacuerpos no 10 monoespecíficos requiere el ensamble exitoso de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (*es decir*, tal formación requiere que los diacuerpos se formen a través de heterodimerización de diferentes cadenas de polipéptidos). Este hecho está en contraste con los diacuerpos 15 monoespecíficos, que se forman a través de la homodimerización de cadenas de polipéptidos idénticas. Debido 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 20 tales polipéptidos conduce a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant 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 25 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 Recombinant
 15 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).

[0072] 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
 25 Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor*

Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

[0073] Ante este desafío, la técnica ha tenido éxito en 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 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 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 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
 5 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-
 10 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
 15 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
 20 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.*

25 **[0074]** 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 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 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 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 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 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 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 la **Figura 2** y las **Figuras 3A-3C**, uno o ambos polipéptidos pueden poseer adicionalmente la 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 secuencia, y se modifican ventajosamente para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas de polipéptidos.

[0075] Se han descrito muchas variaciones de tales moléculas (véase, *por ejemplo*, Publicaciones de Patentes de

los Estados Unidos No. 2015/0175697; 2014/0255407; 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 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 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

5 **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas de tres variaciones de tales diacuerpos que utilizan diferentes Dominios Promotores de Heterodimerización.

[0076] Otras regiones que contienen diacuerpos DART® pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer

10 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

15 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 CH2-CH3. De este modo, la primera y segunda cadena de polipéptidos de tales diacuerpos DART® se

20 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 complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo

25 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 particular, la primera y tercera cadena de polipéptidos forman complejos entre sí para formar una Región
5 de Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Las **Figuras 4A-4B** proporcionan esquemas de tales diacuerpos que comprenden tres cadenas de polipéptidos.

[0077] Aún otras diacuerpos DART® que contienen Regiones de Fc pueden comprender cinco cadenas de polipéptidos que pueden
10 comprender las regiones de unión para los Dominios Variables de Cadena Pesada y Ligera de hasta tres inmunoglobulinas diferentes (conocidas como VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3). Por ejemplo, la primera cadena de polipéptidos de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VH1,
15 (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda y quinta cadena de polipéptidos de tales diacuerpos pueden contener: (i) un dominio que contiene VL1, y (ii) un dominio que contiene CL. La tercera cadena de polipéptidos de tales diacuerpos puede
20 contener: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1, (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, (iv) un Dominio que contiene VL2, (v) un Dominio que contiene VH3 y (vi) un Dominio de Promoción de Heterodímero, donde los Dominios de Promoción de Heterodímero promueven la
25 dimerización de la tercera cadena con la cuarta cadena. El

cuarto polipéptido de tales diacuerpos puede contener: (i) un Dominio que contiene VL3, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que promueve heterodimerización y unión covalente con la tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo. Aquí, el primer y tercer complejos de polipéptidos reaccionan entre ellos para formar una Región de Fc. Tales moléculas DART® más complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo unido de forma covalente de manera que cada cadena de polipéptido se une a por lo menos una cadena de unión de polipéptidos a través de una unión de disulfuro que involucra residuos de cisteína. De preferencia, tales dominios se ordenan en dirección N-terminal a C-terminal. La **Figura 5** proporciona esquemas de tales diacuerpos que comprenden cinco cadenas de polipéptidos.

[0078] 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; 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.

[0079] Recientemente, estructuras trivalentes que incorporan dos dominios de unión tipo diacuerpo y un dominio tipo no diacuerpo y una Región de Fc se han descrito (véase, 5 *por ejemplo*, Solicitud PCT No: PCT/US15/33076, titulada "Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof," presentada el 29 de mayo de 2015; y PCT/US15/33081, titulada "Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to 10 Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof," presentada el 29 de mayo de 2015). Tales moléculas trivalentes se pueden utilizar para generar moléculas monoespecíficas, biespecíficas o triespecíficas. Las **Figuras 6A-6F** proporcionan esquemas de tales moléculas trivalentes que 15 comprenden 3 o 4 cadenas de polipéptidos.

IV. Moléculas de Unión a LAG-3 Biespecíficas de la Presente Invención

[0080] Las moléculas de unión a LAG-3 preferidas de la presente invención incluyen anticuerpos, diacuerpos, BiTEs, 20 *etc.* y son capaces de unirse a una porción continua o 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 25 unirse a moléculas de LAG-3 de una o más especies no humanas,

en particular, especies de primates (y especialmente a una 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:5**):

MWEAQFLGLL **FLQPLWVAPV** **KPL**QPGA EVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
 10 VLSVGPGLR SGRPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
 VHLRDRLSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
 HWFRNRGQGR VPVRESPPHH LAESFLELPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
 PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLEQEQ QLNATVTLAI
 15 ITVTPKSFGS PGS LGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGA AVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
 LLFLILGVLS LLLLV TGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
 ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

[0081] En ciertas modalidades las moléculas de unión de 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;
- 25 (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) una específicamente LAG-3 de primate no humano (por ejemplo, LAG-3 de mono cynomolgus);

(5) una específicamente LAG-3 de primate no humano con una constante de equilibrio de unión (K_D) de 50 nM o menos;

(6) una específicamente LAG-3 de primate no humano con una constante de equilibrio de unión (K_D) de 5 nM o menos;

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

(8) estimula una respuesta inmune;

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

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

(11) 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

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

[0082] 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 específica hacia una estimulación con antígeno incluyen la producción y proliferación de citocina (por ejemplo, producción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$). 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*.

[0083] 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_H s del Dominio VH y/o 1, 2 o las 3 CDR_L s del Dominio VL de tales anticuerpos monoclonales anti-LAG-3. Tales moléculas de unión a LAG-3 preferidas incluyen anticuerpos biespecíficos (o multiespecíficos), anticuerpos quiméricos o humanizados, BiTcs, diacuerpos, etc, y tales moléculas de unión tienen Regiones de Fc variables.

[0084] 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 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;

(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;

(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 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;

5 (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;

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

10 (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 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;

(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;

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

25 (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-
5 3 del anticuerpo anti-LAG-3;

(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
10 anti-LAG-3;

(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;

15 (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-
20 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;

(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
25 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 1 de hLAG-3 del anticuerpo anti-LAG-3;

5 (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

que une , o compite por la unión con, el epítipo que une
10 inmunoespecíficamente 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

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

[0085] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 1 de LAG-3 (**SEQ ID NO:6**) 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:8**): **NYGMN**

CDR_H2 mAb 1 de LAG 3 (**SEQ ID NO:9**): **WINTYTGESTYADDFEG**

CDR_H3 mAb 1 de LAG 3 (**SEQ ID NO:10**): **ESLYDYYSMDY**

25 [0086] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio

VH de mAb 1 de LAG-3 es **SEQ ID NO:7** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

[0087] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 1 de LAG-3 (**SEQ ID NO:11**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKKSSQSLH HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
 15 RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHTFP
YTFGGGTKLE IK

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

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

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

20 **[0088]** Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 1 de LAG-3 es **SEQ ID NO:12** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatgttgtgg tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca
 accagcctcc atctcttgca a agtcaagtca gagcctctta catagtgatg
 25 gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccagag

cgctaatact at ctggtgtc tgaactggac tctggagttc ctgacaggtt
 cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg
 aggctgagga tttgggagtt tattattgct t ggcaaggta acattttccg
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

5

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

[0089] El mAb 1 de LAG-3 del Anticuerpo anti LAG-3 de
 10 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**
 15 **de 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
 20 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
 particulares de los Dominios VH/VL humanizados se denominan,
 por referencia, como los dominios VH/VL específicos, por
 25 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."

[0090] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de **VH-1 de mAb 1 de hLAG-3** (SEQ ID NO:16) se muestra a continuación
5 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

[0091] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VH-1 de mAb 1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:17** (los nucleótidos que codifican los
10 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

20 [0092] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de **VH-2 de mAb 1 de hLAG-3** (SEQ ID NO:18) se muestra a continuación
(los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYFCARES

LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

[0093] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VH-2 de mAb 1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:19** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

[0094] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-1 de mAb 1 de hLAG-3** (**SEQ ID NO:20**) se muestra a continuación
 15 (los residuos CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVG VYCYWQTHFP
YTFGGGKVE IK

[0095] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-1 de mAb 1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:21** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcggtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga cccaggtca
 gcccgctagt atttctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca aagtccagag
 25 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt

ctcaggggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgtt ggcaggggtac ccacttcct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

- [0096] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-2**
 5 **de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:22)** se muestra a continuación
 (los residuos CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
YTFGGGKVE IK

- 10 [0097] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-2 de mAb**
1 de hLAG-3 es **SEQ ID NO:23** (los nucleótidos que codifican
 los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcggtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca
 gcccgctagt atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
 15 gaaagaccta tttgaactggt cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcaggggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgtt ggcaggggtac ccacttcct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

- 20 [0098] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-3**
de mAb 1 de hLAG-3 (SEQ ID NO:24) se muestra a continuación
 (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
 25 YTFGGGKVE IK

[0099] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-3 de mAb 1 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:25** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatatcgтта tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccagggtca
 5 gcccgctagt atttctgtga aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgг cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttcct
 10 tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

[00100] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-4 de mAb 1 de hLAG-3** (**SEQ ID NO:26**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 15 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

[00101] 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):

gatatcgтта tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccagggtca
 20 gcccgctagt atttctgtga aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
caaagaccta tttgaactgг cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 25 aggccgagga cgtcgggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttcct

tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

[00102] 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: **KSSQSLHSDAKTYLN** (SEQ ID NO:28), 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.

10 B. El mAb 2 de LAG-3 de anticuerpo Anti-LAG-3

[00103] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 2 de LAG-3 (SEQ ID NO:29) se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

CDR_H1 mAb 2 de LAG 3 (SEQ ID NO:31): DYNIH

CDR_H2 VH de mAb 2 de LAG-3 (SEQ ID NO:32):

YIYPYSGDIGYNQKFKN

20 CDR_H3 VH de mAb 2 de LAG-3 (SEQ ID NO:33): WHRNYFGPWFAY

[00104] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 2 de LAG-3 es **SEQ ID NO:30** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
25 agtgaagatt tcctgcaaga cttctggata cacatttact gactacaaca

tacactggtt gaggcagagc catggagaga gccttgagtg gattggatat
atttatacctt acagtgggtga tattggatac aaccagaagt tcaagaacag
ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
5 aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactccggt
cactgtctct gca

[00105] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 2 de LAG-3 (**SEQ ID NO:34**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

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

CDR_L1 mAb 2 de LAG 3 (**SEQ ID NO:36**): **KASQSVDYDGESYMN**

CDR_L2 mAb 2 de LAG 3 (**SEQ ID NO:37**): **VVSNNLES**

15 CDR_L3 mAb 2 de LAG 3 (**SEQ ID NO:38**): **QQSSEDPLT**

[00106] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 2 de LAG-3 es **SEQ ID NO:35** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
20 gagggccacc atctcctgca a aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
ctcatttatg ttgtatccaa tctagaatctgggatcccag ccagggttag
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
25 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

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

[00107] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 3 de LAG-3 (**SEQ ID NO:39**) se muestra a continuación (los
5 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVRLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNIHWVRQS HGQSLEWIGY
IYPYNGDTGY NQKFKTATL TVDNSSNTAY MELRSLASED SAVYYCTRWS
RNYFGPWFAY WGQGTTLVTVS A

CDR_H1 mAb 3 de LAG 3 (**SEQ ID NO:41**): **DYNIH**

10 CDR_H2 mAb 3 de LAG 3 (**SEQ ID NO:42**): **YIYPYNGDTGYNQKF**KT

CDR_H3 mAb 3 de LAG 3 (**SEQ ID NO:43**): **WSRNYFGPW**FAY

[00108] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 3 de LAG-3 es **SEQ ID NO:40** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

15 gaggtccggc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaagata tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
ttcactgggt gaggcagagc catggacaga gccttgagtg gattggatat
atttatacctt ataatggtga tactggctac aaccagaagt tcaagaccaa
ggccacattg actgtagaca attcctccaa cacagcctac atggaactcc
20 gcagcctggc atctgaagac tctgcagtct attactgtac aagatggagc
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
cactgtctct gca

[00109] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 3 de LAG-3 (**SEQ ID NO:44**) se muestra a continuación (los
25 residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPTS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL
TFGAGTKLEL K

CDR_L1 mAb 3 de LAG 3 (SEQ ID NO:46): KASQSVDYDGDSYMN

5 CDR_L2 mAb 3 de LAG 3 (SEQ ID NO:47): AASNLES

CDR_L3 mAb 3 de LAG 3 (SEQ ID NO:48): QQSSEDPLT

[00110] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 3 de LAG-3 es SEQ ID NO:45 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

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

[00111] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 4
 20 de LAG-3 (SEQ ID NO:49) se muestra a continuación (los
 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVQLHQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYNGDAGY NONFKTKATL TVDNSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARWN
MNYFGPWFAY WGQGTTLVTVS A

25 CDR_H1 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:51): DYNIH

CDR_H2 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:52): **YIYPYNGDAGYNQNFKT**

CDR_H3 mAb 4 de LAG 3 (SEQ ID NO:53): **WNMNYFGPWFAY**

[00112] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VH de mAb 4 de LAG-4 es **SEQ ID NO:50** (los nucleótidos que
5 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc ttcaccagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaaagata tcttgcaaga cttctggata cactttcact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattggatat
atttatacctt acaatgggtga tgctggctac aaccagaact tcaagaccaa
10 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggagctcc
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggaac
atgaactact ttggccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
cactgtctct gcg

[00113] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 4
15 de LAG-3 (**SEQ ID NO:54**) se muestra a continuación (los
residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGVITYINWY QQKPGQPPKL
LIFAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSNEDPL
TFGAGTKLEL K

20 CDR_L1 mAb 4 de LAG 3 (**SEQ ID NO:56**): **KASQSVDYDGVITYIN**

CDR_L2 mAb 4 de LAG 3 (**SEQ ID NO:7570**): **AASNLES**

CDR_L3 mAb 4 de LAG 3 (**SEQ ID NO:58**): **QQSNEDPLT**

[00114] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 4 de LAG-3 es **SEQ ID NO:55** (los nucleótidos que
25 codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

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

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

10 **[00115]** La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 5
 de LAG-3 (**SEQ ID NO:59**) se muestra a continuación (los
 residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNIHWVKQS PGKSLEWIGY
IYPYSGDFGY NQKFKSKATL TVDNSSSTAY MDLRSLTSED SAVFYCARWH
 15 RNYFGPWFAY WGQGTILVTVS A

CDR_H1 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:61**): **DYNIH**

CDR_H2 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:62**): **YIYPYSGDFGYNQKFKS**

CDR_H3 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:63**): **WHRNYFGPWFAY**

[00116] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio
 20 VH de mAb 5 de LAG-3 es **SEQ ID NO:60** (los nucleótidos que
 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagatt tcctgcaaag cttctggata cacatttact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc cctggaaaga gccttgaatg gattggattat
 25 atttatcctt acagtgggtga ttttggatac aaccagaagt tcaagagcaa

ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
cactgtctct gca

- 5 **[00117]** La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 5 de LAG-3 (**SEQ ID NO:64**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

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

CDR_L1 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:66**): **KASQSVDYDGESYMN**

CDR_L2 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:67**): **VVSNNLES**

CDR_L3 mAb 5 de LAG 3 (**SEQ ID NO:68**): **QQSSEDPLT**

- 15 **[00118]** Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 5 de LAG-3 es **SEQ ID NO:65** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
gagggccacc atctcctgcaa aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
20 ctcatthtatg ttgtttccaa tctagaatctgggatcccag ccaggthtag
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
acqttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

- 25 **F. El mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo Anti-LAG-3**

1. El mAb 6 de LAG-3 del Anticuerpo antihumano de Murino

[00119] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de mAb 6 de LAG-3 (**SEQ ID NO:69**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

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

CDR_H1 mAb 6 de LAG 3 (**SEQ ID NO:71**): **DYNMD**

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

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

[00120] 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):

15 gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggccttc
 agtgaagata ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
tggactgggt gaagcagagc catggagaga gccttgagtg gattggaggat
attaatcctg acaatggtgt tactatctac aaccagaagt ttgagggcaa
 ggccacactg actgtagaca agtcctccag tacagcctac atggagctcc
 20 gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagagggc
gattacttct actttgacta ctgggggcca ggcaccactc tcacagtctc
 ctca

[00121] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de mAb 6 de LAG-3 (**SEQ ID NO:74**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQQKP GQSPKLLIFS
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

CDR_L1 mAb 6 de LAG 3 (SEQ ID NO:76): **KASQDVSSVVA**

5 CDR_L2 mAb 6 de LAG 3 (SEQ ID NO:77): **SASYRYT**

CDR_L3 mAb 6 de LAG 3 (SEQ ID NO:78): **QQHYSTPWT**

[00122] Un polinucleótido ejemplar que codifica el Dominio VL de mAb 6 de LAG-3 es **SEQ ID NO:75** (los nucleótidos que codifican los CDR se muestran subrayados):

10 gacattgtga tgaccagtc tcacagattc atgtccacat cagttggaga
 cagggtcagc atcacctgca a aggccagtc a ggatgtgagt tctgtttag
cctggtatca acagaaacca ggacaatctc ctaaattact gattttttcg
gcaccctacc ggtacactgg agtcctgat cgcttcactg gcagtggatc
 tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct gcagacctgg
 15 cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcgggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

2. Humanización del mAb 6 de LAG-3 del anticuerpo anti LAG-3 para Formar "mAb 6 de hLAG-3"

[00123] El mAb 6 de LAG-3 del Anticuerpo anti LAG-3 de murino
 20 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 6 de hLAG-3**" y "**VH-2**
 25 **de mAb 6 de hLAG-3** ," y dos Dominios VL humanizados designados

en la presente como **"VL-1 de mAb 6 de hLAG-3,"** y **"VL-2 de mAb 6 de hLAG-3 ."** Cualquiera de los Dominios VL humanizados pueden aparearse con cualquiera de los Dominios VH humanizados. Por consiguiente, cualquier anticuerpo que comprende uno de los Dominios VL humanizados apareados con el Dominio VH humanizado que se conoce genéricamente como **"mAb 6 de hLAG-3,"** y las combinaciones 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 6 de hLAG-3 y VL-2 de mAb 6 de hLAG-3 se denomina específicamente como **"mAb 6 (1.2) de hLAG-3."**

[00124] La secuencia de aminoácidos del Dominio VH de **VH-1 de mAb 6 de hLAG-3 (SEQ ID NO:79)** se muestra a continuación (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

15 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

[00125] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VH-1 de mAb 6 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:80** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

20 caggtccagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcaag
cgtgaagggtg tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacaaca
tggactgggt ccgacaggcc ccaggacagg gcctggaatg gatgggcgac
atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac aaccagaaat tcgagggcag
25 agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac atggaactgc

ggtcctcg gagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
gactacttct acttcgacta ctgggggccag ggcaccaccc tgaccgtgtc
 ctcc

[00126] Una secuencia de aminoácidos del Dominio VH de **VH-2**
 5 **de mAb 6 de hLAG-3 (SEQ ID NO:81)** se muestra a continuación
 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

10 [00127] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VH-2 de mAb**
6 de hLAG-3 es **SEQ ID NO:82** (los nucleótidos que codifican
 los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggtccagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcggcag
 cctgagactg agctgcgctg ccagcggctt caccttcagc gactacaaca
 15 tggactgggt ccgacaggcc cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccgac
atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac aaccagaagt tcgagggccg
 gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga
 acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
gactacttct acttcgacta ctgggggccag ggcaccaccc tgaccgtgtc
 20 ctcc

[00128] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-1**
de mAb 6 de hLAG-3 (SEQ ID NO:83) se muestra a continuación
 (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS

ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIK

[00129] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-1 de mAb 6 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:84** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga
cagagtgacc atcacctgtc c gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg
cctggtatca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc
gccagctacc ggtacacagg cgtgcccagc agattcagcg gcagcggctc
10 cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc gaggacttcg
ccacctaacta ctgccagcag cactacagca cccctggac cttcggcgga
ggcaccaagc tggaaatcaa g

[00130] La secuencia de aminoácidos del Dominio VL de **VL-2 de mAb 6 de hLAG-3** (**SEQ ID NO:85**) se muestra a continuación (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPD RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIK

[00131] Un polinucleótido ejemplar que codifica **VL-2 de mAb 6 de hLAG-3** es **SEQ ID NO:86** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga
cagagtgacc atcacctgtc c gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg
cctggtatca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc
25 gccagctacc ggtacacagg cgtgcccgat agattcagcg gcagcggctc

cggcaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc gaggacatcg
 ccgtttacta ctgccagcag cactacagca ccccctggac cttcggcgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa g

[00132] Las CDR_L1 del Dominio VL de VL-1 y VL-2 de mAb 2 de
 5 hLAG-3 comprende una sustitución de aminoácidos de licina a
 alanina y tiene la secuencia de aminoácidos: RASQDVSSVVA (SEQ
 ID NO:87), la arginina sustituida se muestra subrayada). Se
 contempla que una sustitución similar puede incorporarse en
 cualquiera de los Dominios CDR_L6 de mAb 1 de LAG-3 descritos
 10 en lo anterior.

[00133] 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
 15 presente pueden sustituirse para facilitar la subclonación.

V. **mAb 1 de LAG-3 de Anticuerpos Anti-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 Sus Derivados Que Tienen una
 20 Región de Fc Diseñada**

[00134] 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
 desde las funciones efectoras tales como la citotoxicidad
 25 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

5 a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La 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*,

10 mejora del 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 del IgG1 ejemplar (**SEQ ID NO:1**), IgG2 (**SEQ ID NO:2**), IgG3 (**SEQ ID NO: 3**), e IgG4 (**SEQ ID NO:4**) se presentan en lo anterior.

[00135] La modificación de la Región de Fc por lo regular lleva a un fenotipo alterado, por ejemplo, vida media alterada

20 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

25 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

5 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).

10 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.

15 **[00136]** 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*

20 *ejemplo*, **SEQ ID NO:1**), las cuales reducen la afinidad y 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 de la invención comprenden una Región de Fc que posee una o más modificaciones a los

25 aminoácidos de la Región de Fc de tipo silvestre, lo que

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
5 confiere o media la actividad de la citotoxicidad mediada por 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
10 comprenden una Región de Fc variante en donde tal variante 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
15 modalidades, la invención abarca moléculas de unión a LAG-3 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
20 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 avidéz incrementada se evalúa de preferencia al medir *in vitro* el grado de la unión
25 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
5 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
10 moléculas/células o menor (pero al menos 10, 50, 100 o 150 moléculas/células).

[00137] 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
15 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,
20 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
25 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.

10 **[00138]** 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
15
20 complementos.

[00139] 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,
25 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%,
5 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
10 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.

[00140] En diferentes modalidades, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una Región de Fc
15 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 moléculas comprenden una variante que antagoniza una o más actividades de FcγRIIB, por ejemplo, señalización mediada por
20 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, inhibición mediada por FcγRIIB de señalización de FcεRI, fosforilación de FcγRIIB, incorporación de SHIP,
25 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 transducción de señal de FcγRIIB. En otra modalidad, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención comprenden una variante que
 5 agoniza una o más actividades de FcεRI, por ejemplo, activación de mastocitos, movilización de calcio, desgranulación, producción de citocina, o liberación de serotonina.

[00141] En ciertas modalidades, las moléculas comprenden una
 10 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.
 15 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
 20 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-
 25 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.

[00142] 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 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 Sondermann *et al.* (2000) Nature 406:267-73. Los ejemplos de posiciones dentro de la Región de Fc que hacen contacto directo con FcγR son
5 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
10 modificación de al menos un residuo que no hace un contacto 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.

[00143] Las Regiones de Fc variantes son bien conocidas en
15 la técnica, y cualquier Región de Fc variante conocida puede 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
20 dependiente de NK o un ensayo dependiente de macrófagos. Por 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
25 2008/140603, y cualquier variante adecuada descrita en las

mismas puede utilizarse en las moléculas presentes.

[00144] 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 FcγR de inhibición (tal como FcγRIIB):

$$\text{Relación de Afinidades} = \frac{\text{Tipo Natural a Cambio de Variante en Afinidad en Fc}\gamma\text{R}_{\text{Activación}}}{\text{Tipo Natural a Cambio de Variante en Afinidad en Fc}\gamma\text{R}_{\text{Inhibición}}}$$

[00145] Particularmente, se prefieren moléculas de unión a 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 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 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	F243L, R292P & P396L	F243L, P247L, D270E & N421K	
	R292P & Y300L	F243L, Y300L & P396L	F243L, R255L, D270E & P396L	
	R292P &	P247L, D270E & N421K	F243L, D270E, G316D & R416G	

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

Tabla 1 Mutaciones Sencillas y Múltiples Ejemplares Listadas por Relación de Afinidades				
Senci lla	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
Relación de Afinidades < 1				
Y300L	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I		
P396L	P247L & N421K			
	R255L & P396L			
	R292P & V305I			
	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

[00146] 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 preferencia uno o más de los siguientes residuos: A240, I240, 5 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, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 10 333, 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.

[00147] En una modalidad preferida, en Regiones de Fc 15 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, 20 309, 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, 25 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.

[00148] En una modalidad diferente, en Regiones de Fc variantes que unen un FcγR (mediante su Región de Fc) con una
 5 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
 10 439.

[00149] 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 ejemplo*, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280,
 15 283, 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 siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268,
 20 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.

[00150] Las variantes preferidas incluyen una o más modificaciones en cualquiera de las posiciones: 228, 230,
 25 231, 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.

[00151] 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 or 284M;
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

[00152] 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	63	S239D / N297D / I332E

	/ V264R / 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 / I332E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

[00153] 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

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.

[00154] En una modalidad específica, la Región Fc variante
5 comprende:

(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:

10 (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:

15 (1) F243L, R292P y Y300L;

(2) F243L, R292P y V305I;

(3) F243L, R292P y P396L; y

(4) R292P, V305I y P396L;

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

(1) F243L, R292P, Y300L y P396L; y

(2) F243L, R292P, V305I y P396L; o

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

25 (1) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L; y

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L.

[00155] En otra modalidad específica, la Región de Fc variante comprende sustituciones de:

(A) F243L, R292P, y Y300L;

5 (B) L235V, F243L, R292P, Y300L, y P396L; o

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I, y P396L.

[00156] En una modalidad, una molécula de unión de LAG-3 de la invención comprende una Región de Fc variante que muestra unión disminuida (o sustancialmente sin ella) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o 10 FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la Región de Fc de IgG1 en estado natural (**SEQ ID NO:1**)). En una modalidad, una molécula de unión de LAG-3 de la invención comprenderá una Región de Fc variante que muestra unión 15 reducida (o sustancialmente sin ella) a un FcγR (*por ejemplo*, FcγRIIIA) y función efectora de ADCC (o sustancialmente sin ella). En ciertas modalidades, la Región de Fc variante comprende al menos una sustitución seleccionada a partir del grupo que consiste de L234A, L235A, D265A, N297Q, y N297G. 20 En una modalidad específica, la Región de Fc variante comprende la sustitución de L234A; L235A; L234A y L235A; D265A; N297Q, o N297G.

[00157] En una modalidad diferente, una molécula de unión de LAG-3 de la invención comprende una Región de Fc que muestra 25 de forma inherente unión disminuida (o sustancialmente sin

ella) a FcγRIIIA (CD16a) y/o función efectora reducida (en relación con la unión mostrada por la Región de Fc de IgG1 en estado natural (**SEQ ID NO:1**)). En una modalidad específica, una molécula de unión de LAG-3 de la presente invención

5 comprende una Región de Fc de IgG2 (**SEQ ID NO:2**) o una Región de Fc de IgG4 (**SEQ ID:NO:4**). Cuando se utiliza una Región de Fc de IgG4, la invención actual también abarca la introducción de una mutación de estabilización, tal como la sustitución de la región S228P de bisagra de IgG4 (véase, por ejemplo,

10 **SEQ ID NO:117**: ESKYGPPCPPCP, (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) para reducir la incidencia de intercambio de trenzados. Otras mutaciones de estabilización conocidas en

15 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

20 2008/145142).

[00158] En otras modalidades, la invención abarca el uso de 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 FcγgammaR: Current

25 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 C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric
 10 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 Effector
 15 Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26;
 Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules
 Lacking Fc gamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering
 Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al.
 (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement
 20 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
 25 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; Jefferis, R. et
 al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma
 5 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 Gamma
 Receptors," FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A
 Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody
 10 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
 R11," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc
 Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But
 15 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
 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
 20 PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

[00159] 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
 25 preferencia, las moléculas de la invención con uno o más

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

5 modalidades, la invención además comprende moléculas que 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,

10 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, o 301. Los 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

15 presente para referencia en su totalidad.

[00160] 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*,

20 actividad de unión al antígeno objeto o Fc γ . 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

25 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

5 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

10 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

15 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

20 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, 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

25 totalidad. Un método ejemplar para introducir un sitio de

glicosilación en una molécula de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácido de la molécula de modo que se obtiene la secuencia Asn-X-Thr/Ser.

[00161] En algunas modalidades, la invención abarca métodos
5 para modificar el contenido de carbohidrato de una molécula 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
10 bien en la técnica y se abarcan dentro de la invención, 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.
15 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
20 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
25 modo que la posición 296 y ninguna posición 297 se glicosila.

[00162] 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
5 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*
10 *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
15 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
20 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).

[00163] La vida media del suero de las moléculas de la
25 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
5 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
10 *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

[00164] En algunas modalidades, las moléculas de unión a
15 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).

20 **[00165]** 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,
25 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311,

312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, y 436, 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, M252Y, S254T, T256E, 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 WO 2009/058492, y WO 2010/033279, las cuales se incorporan en la presente para referencia en sus totalidades. Las moléculas que 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, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 y 436. En particular, dos o más sustituciones seleccionadas a partir de: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, y Y436I.

[00166] En una modalidad específica, la Región Fc variante comprende sustituciones de:

(A) 252Y, 254T y 256E;

(B) M252Y y S254T;

(C) M252Y y T256E;

(D) 250Q y 428L;

(E) T307Q y N434A;

(F) A378V y N434A;

(G) N434A y Y436I;

(H) V308P y N434A; o

5 (I) K288D y H435K.

[00167] La invención actual además abarca Regiones Fc variantes que comprenden:

(A) una o más mutaciones que alteran la función efectora y/o FcγR; y

10 (B) una o más mutaciones que extienden la vida media del suero.

VI. Moléculas de Unión al LAG-3 Biespecíficas de la Presente Invención

15 **[00168]** Una modalidad de la presente invención se relaciona con moléculas de unión biespecíficas que son capaces de unirse a un **"primer epítopo"** y a un **"segundo epítopo,"** en donde el primer epítopo es un epítopo de LAG-3 humano y el segundo epítopo es el mismo o un epítopo diferente de LAG-3, o es un

20 epítopo de otra molécula que se encuentra presente en la superficie de una célula inmune (tal como un linfocitos T) y se involucra en la regulación de un punto de control inmune. En ciertas modalidades, el segundo epítopo de preferencia no es un epítopo de LAG-3. En una modalidad, el segundo epítopo

25 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, 5 TIM-3 o VISTA. En una modalidad específica, el segundo epítopo es CD137, PD-1, OX40, TIGIT, o TIM-3. En ciertas modalidades, tales moléculas biespecíficas comprenden más de dos sitios de unión al epítopo. Tales moléculas biespecíficas pueden, por ejemplo, unir dos o más epítopos diferentes de LAG-3 y 10 al menos un epítopo de una molécula que no es LAG-3.

[00169] La invención actual abarca anticuerpos biespecíficos capaces de unirse simultáneamente a LAG-3 y al segundo epítopo (*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.*). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico capaz de unirse simultáneamente a PD-1 y al segundo epítopo se produce al utilizar cualquiera de los métodos descritos en la Publicación PCT Números WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, 20 WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 25 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583,

de tal diacuerpo biespecífico. En una modalidad, el Epítopo 1 de tales moléculas de diacuerpo es un epítopo de LAG-3 y el Epítopo 2 de tales moléculas de diacuerpo no es un epítopo de LAG-3 (por ejemplo, es 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.*).

[00171] El Dominio VL de la primera cadena de polipéptidos de tales diacuerpos de unión al LAG-2 interactúa con el Dominio VH de la segunda cadena de polipéptidos para formar un primer sitio de unión al epítopo funcional que es específico para un primer epítopo (*es decir*, ya sea el LAG-3 o un antígeno que contiene el segundo epítopo). 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 epítopo funcional que es específico para un segundo antígeno (*es decir*, ya sea un antígeno que contiene el segundo epítopo 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 epítopo de LAG-3 y al segundo epítopo (*es decir*, comprenden de forma colectiva Dominios VL_{LAG-3}/VH_{LAG-3} y VL_{Epítopo 2}/ VH_{Epítopo 2}). Es irrelevante si un par particular de dominios de unión (*i.e.*, VL_{Epítopo 1} / VH_{Epítopo 1} o VL_{Epítopo 2} /

VH_{Epítopo 2}) un epítopo de un antígeno que tiene Epítopo 1 o un epítopo de un antígeno que tiene Epítopo 2) se diseña como el primero contra el segundo epítopo del diacuerpo; tal como la notación que tiene relevancia solo con respecto a la presencia y orientación de los dominios de las cadenas de polipéptidos de las moléculas de unión de la presente invención

[00172] 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 epítopo o el Dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al segundo epítopo (*es decir*, ya sea VL_{LAG-3} o VL_{Epítopo 2}), un primer péptido separador de intervención (Enlazador 1), un Dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera del segundo epítopo (si tal primera cadena de polipéptidos contiene VL_{LAG-3}) o un Dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al primer epítopo (si tal primera cadena de polipéptidos contiene VL_{Epítopo 2}), un segundo péptido separador de intervención (Enlazador 2), que comprende de manera opcional un residuo de cisteína, un Dominio de Promoción de Heterodímero y un C-Término (**Figura 1**).

[00173] 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
 5 Dominio VL no se selecciona para inclusión en la primera
 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
 10 Dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-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**
 15 **1**).

[00174] 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
 20 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
 25 unirse entre sí. Un péptido separador preferido de

intervención (Enlazador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:88**):
GGGSGGGG.

[00175] La longitud y composición del segundo péptido enlazador de intervención (Enlazador 2) se selecciona en base
5 a la elección de los dominios de promoción de heterodímero. De forma típica, el segundo péptido enlazador de intervención (Enlazador 2) comprenderá de 3-20 residuos de aminoácidos. En particular, donde los dominios de promoción de heterodímero no comprenden un residuo de cisteína, se utiliza
10 un segundo péptido enlazador de intervención que contiene cisteína (Enlazador 2). 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
15 secuencia (**SEQ ID NO:89**): GGCGGG. Alternativamente, el Enlazador 2 no comprende una cisteína (*por ejemplo*, GGG, GGGS (**SEQ ID NO:90**), LGGGSG (**SEQ ID NO:91**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:92**), ASTKG (**SEQ ID NO:93**), LEPKSS (**SEQ ID NO:94**), APSSS (**SEQ ID NO:95**), *etc.*) y se utiliza un Dominio de Promoción
20 de Heterodímero que Contiene Cisteína, como se describe a continuación. De manera opcional, tanto un Enlazador 2 que contiene cisteína y un Dominio de Promoción de Heterodímero que contiene cisteína se utilizan.

[00176] Los Dominios de Promoción de Heterodímero pueden ser
25 GVEPKSC (**SEQ ID NO:96**) o VEPKSC (**SEQ ID NO:97**) o AEPKSC (**SEQ**

ID NO:98) en una cadena de polipéptidos y GFNRGEC (**SEQ ID NO:99**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:100**) en la otra cadena de polipéptidos (US2007/0004909).

[00177] De mayor preferencia, sin embargo, los Dominios de Promoción de Heterodímero de tales diacuerpos se forman a 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 (Apostolović, B. et al. (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 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 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-Rodriquez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And
5 *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 Protein Structures," Acta Crystallographica D65:1032-1041;*
10 *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;*
15 *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*
20 *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*
25 *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*
 5 *With Altered Tropism*," J. Gene Med. 10:355-367).

[00178] 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
 10 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
 15 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,
 20 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
 25 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
 5 primera y la segunda cadena de polipéptidos de los diacuerpos de la presente invención contengan Dominios de Promoción de Heterodímero.

[00179] En una modalidad preferida, uno de los Dominios de Promoción de Heterodímero comprenderá cuatro dominios
 10 helicoidales de hélice "E-hélice" en tándem (**SEQ ID NO:101:** EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), cuyos residuos de glutamato formarán una carga negativa en pH 7, mientras que los demás Dominios de Promoción de Heterodímero comprenderán cuatro dominios helicoidales "K-hélice" en tándem (**SEQ ID**
 15 **NO:102:** KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), 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 segundo polipéptido, y de este modo fomenta la formación de heterodímero. Especialmente, se prefiere un
 20 Dominio de Promoción de Heterodímero en el que uno de los cuatro dominios "E-hélice" en tándem de **SEQ ID NO:101** se modificó para contener un residuo de cisteína: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:103**). De igual forma, se prefiere un Dominio de Promoción de Heterodímero en el que
 25 uno de los cuatro dominios "K-hélice" en tándem de **SEQ ID**

NO:102 se modificó para contener un residuo de cisteína:

KVAACKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:104).

[00180] Como se describe en WO 2012/018687, con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de

5 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.

10 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

15 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus* 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-*

20 *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 *Streptococcus*, y

25 de más preferencia, el Dominio de Unión de Albúmina 3 (ABD3)

de proteína G de la cepa G148 de Estreptococo (**SEQ ID NO:43**):
LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

[00181] Como se describe en WO 2012/162068 (incorporada en la presente para referencia), las variantes "**desinmunizadas**"
5 de **SEQ ID NO:105** 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;
10 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
15 variante que tiene la secuencia de aminoácido:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀ **A**₇₁EGVKALIDE ILAALP
(**SEQ ID NO:106**),

O la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA₆₄**A**₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉E ILAALP
20 (**SEQ ID NO:107**),

O la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**S**₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉E ILAALP
(**SEQ ID NO:108**),

se prefieren, particularmente, como tal ABD desinmunizada que
25 muestra unión sustancialmente en estado natural mientras que

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**). 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 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 lugar del Dominio CH1, se puede emplear un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GVEPKSC (**SEQ ID NO:96**) VEPKSC (**SEQ ID NO:97**), o AEPKSC (**SEQ ID NO:98**), derivada del dominio bisagra de un IgG humano, y en lugar del Dominio CL, se puede emplear los 6 aminoácidos de C-terminal aminoácidos de la cadena ligera kappa, GFNRGEC (**SEQ ID NO:99**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:100**). 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:101: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** o **SEQ ID NO:103: EVAAÇEK-**

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); y los dominios "K-hélice" (SEQ ID NO:102: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK o SEQ ID NO:104: KVAAÇEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK). Un dominio helicoidal representativo que contiene el diacuerpo de cuatro cadenas se muestra en la **Figura 3B**.

[00184] Las moléculas de diacuerpo que contienen Región Fc de la presente invención por lo general incluyen péptidos enlazadores de intervención adicionales (Enlazadores). De forma típica, los Enlazadores adicionales comprenderán de 3-20 residuos de aminoácidos. Los enlazadores adicionales o alternativos que pueden emplearse en las moléculas de diacuerpo que contienen Región Fc de la presente invención incluyen: GGGS (SEQ ID NO:90), LGGGSG (SEQ ID NO:91), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:92), ASTKG (SEQ ID NO:93), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:109), LEPKSS (SEQ ID NO:94), APSSS (SEQ ID NO:95), y APSSSPME (SEQ ID NO:110), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:111), GGC, y GGG. SEQ ID NO:94 puede utilizarse en lugar de GGG o GGC para facilidad de clonación. Adicionalmente, los aminoácidos GGG, o SEQ ID NO:94 pueden seguirse inmediatamente por SEQ ID NO:109 para formar los enlazadores alternativos: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:112); y LEPKSSDKTHTCPPC; (SEQ ID NO:113). La molécula de diacuerpo que contiene Región Fc de la presente invención puede incorporar una región bisagra de IgG además de o en lugar de un enlazador. Las regiones bisagra ejemplares incluyen:

EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:114**) de IgG1, ERKCCVECPSCP (**SEQ ID NO:115**) de IgG2, ESKYGPPCPSCP (**SEQ ID NO:116**) de IgG4, y ESKYGPPCPPCP (**SEQ ID NO:117**) una variante de bisagra de IgG4 que comprende un sustituto de estabilización para reducir el intercambio de trenzados.

[00185] 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 notación "VL3" y "VH3" indica respectivamente, el Dominio de Cadena Ligera Variable y el Dominio de Cadena Pesada Variable que une el "tercer" epítipo de tal diacuerpo ("**Epítipo 3**"). De

manera similar, la notación "VL4" y "VH4" indica respectivamente, el Dominio de Cadena Ligera Variable y el Dominio de Cadena Pesada Variable que une el "cuarto" epítopo de tal diacuerpo ("**Epítopo 4**"). La estructura general de las

5 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

HPD = Dominio de Promoción de Heterodímero

[00186] En una modalidad específica, los diacuerpos de la

10 presente invención son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes (*es decir*, poseen cuatro sitios de unión a epítopo) (**Figuras 3A-3C**), que se componen de cuatro cadenas de polipéptidos totales. Los diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes, de la invención comprenden

15 dos sitios de unión a epítopo inmunospecíficos para LAG-3 (que pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de LAG-3

o a diferentes epítomos de LAG-3), y dos sitios de unión a epítomo específicos para un segundo epítomo (*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, TIM-3, *etc.*).

5 **[00187]** En una modalidad adicional, los diacuerpos que contienen Región Fc biespecíficos pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer polipéptido de tal diacuerpo contiene tres dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que
10 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 heterodimerización y unión covalente con la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo. El tercer polipéptido de tales
15 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 epítomo, así como un sitio de unión a VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítomo.
20 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
25 disulfuro. Tales diacuerpos tienen potencia mejorada. Las

Figuras 4A y 4B ilustran las estructuras de tales diacuerpos. Tales diacuerpos que contienen Region Fc biespecíficos pueden tener cualquiera de dos orientaciones (**Tabla 3**):

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

HPD = Dominio de Promoción de Heterodímero

- 5 **[00188]** En una modalidad específica, los diacuerpos de la presente invención son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, bivalentes (*es decir*, poseen dos sitios de unión a epítopo) (**Figuras 4A-4B**), que se componen de tres cadenas de polipéptidos totales. Los diacuerpos que contienen
- 10 Fc biespecíficos, bivalentes, de la invención comprenden un sitio de unión a epítopo inmunospecífico para LAG-3, y un sitio de unión a epítopo específico para un segundo epítopo (*por ejemplo*, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC clase I o II de LAG-3, OX40, PD-L1,
- 15 TCR, TIM-3, *etc.*).

[00189] En una modalidad adicional, los diacuerpos que

contienen Región Fc biespecíficos pueden comprender un total de cinco cadenas de polipéptidos. En una modalidad particular, dos de las cinco cadenas de polipéptidos tienen la misma secuencia de aminoácidos. La primera cadena de polipéptidos de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La primera cadena de polipéptidos puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene un VH1 y un región constante de cadena pesada.

La segunda y quinta cadena de polipéptidos de tales diacuerpos contienen: (i) un dominio que contiene VL1, y (ii) un dominio que contiene CL. La segunda y/o quinta cadena de polipéptidos de tales diacuerpos pueden ser las cadenas ligeras de un anticuerpo que contiene un VL1 complementario al VH1 de la primera/tercera cadena de polipéptidos. La primera, segunda y/o quinta cadena de polipéptidos puede aislarse de los anticuerpos que se producen de forma natural. Alternativamente, pueden construirse de forma recombinante. La tercera cadena de polipéptidos de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1, (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, (iv) un Dominio que contiene VL2, (v) un Dominio que contiene VH3 y (vi) un Dominio de Promoción de Heterodímero, donde los Dominios de Promoción de Heterodímero promueven la dimerización de la tercera cadena con la cuarta cadena. El

cuarto polipéptido de tal diacuerpo contiene: (i) un Dominio que contiene VL3, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que promueve heterodimerización y unión covalente con la tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo.

5 **[00190]** De este modo, la primera y segunda, y la tercera y quinta, cadena de polipéptidos de tales diacuerpos se asocian juntos para formar dos sitios de unión a VL1/VH1 capaces de unir un primer epítipo. La tercera y cuarta cadena de polipéptidos de tales diacuerpos se asocian juntos para
10 formar un sitio de unión a VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítipo, así como un sitio de unión a VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítipo. El primer y tercer polipéptido se unen entre sí a través de un enlace disulfuro que involucra residuos de cisteína en sus regiones constantes
15 respectivas. En particular, la primera y tercera cadena de polipéptidos forman complejos entre sí para formar una Región Fc. Tales diacuerpos tienen potencia mejorada. La **Figura 5** ilustra la estructura de tales diacuerpos. Se entenderá que los Dominios VL1/VH1, VL2/VH2, y VL3/VH3 pueden ser los mismos
20 o diferentes para permitir la unión que es monoespecífica, biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan de preferencia para unirse a LAG-3 y un segundo epítipo (o un segundo y un tercer epítipo (*por ejemplo*, B7-H3, B7-H4, BTLA,
25 CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase

I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). El segundo y tercer epítopo pueden ser epítopos diferentes de la misma molécula de antígeno, o pueden ser epítopos de diferentes moléculas de antígeno. Tales aspectos de la invención se discuten a
 5 detalle a continuación.

[00191] De este modo, los Dominios de las cadenas de polipéptidos VL y VH se seleccionan para formar sitios de unión a VL/VH biespecíficos para los epítopos deseados. Los sitios de unión a VL/VH formados por la asociación de las
 10 cadenas de polipéptidos pueden ser los mismos o diferentes para permitir la unión tetravalente que es monoespecífica, biespecífica, triespecífica o tetraespecífica. En particular, los Dominios VL y VH pueden seleccionarse de modo que un diacuerpo biespecífico puede comprender dos sitios de unión
 15 para un primer epítopo y dos sitios de unión para un segundo epítopo, o tres sitios de unión para un primer epítopo y un sitio de unión para un segundo epítopo, o dos sitios de unión para un primer epítopo, un sitio de unión para un segundo epítopo y un sitio de unión para un tercer epítopo (como se
 20 representa en la **Figura 5**). La estructura general de las cadenas de polipéptidos de los diacuerpos que contienen Región Fc de cinco cadenas representativos de la invención se proporciona en la **Tabla 4**:

Tabla 4		
Biespecífico	2 ^a	NH ₂ -VL1-CL-COOH

(2x2)	Cadena	
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	5 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH2-HPD-COOH
Biespecífico (3x1)	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	5 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Triespecífico (2x1x1)	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH

	5 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4 ^a Cadena	NH ₂ -VL3-VH2- HPD-COOH

HPD = Dominio de Promoción de Heterodímero

[00192] En una modalidad específica, los diacuerpos de la presente invención son biespecíficos, tetravalentes (es decir, poseen cuatro sitios de unión a epítipo), diacuerpos

5 que contienen Fc que se componen de cinco cadenas totales de polipéptidos que tienen dos sitios de unión para un primer epítipo y dos sitios de unión para un segundo epítipo. En una modalidad, los diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes, de la invención comprenden dos sitios de unión

10 a epítipo inmunospecíficos para LAG-3 (que pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo de LAG-3 o a diferentes epítopos de LAG-3), y dos sitios de unión a epítipo específicos para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC clase I o II de

15 LAG-3, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En otra modalidad, los diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes, de la invención comprenden tres sitios de unión a epítipo inmunospecíficos para LAG-3 (que pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo de LAG-3 o a diferentes epítopos de LAG-3),

20 y un sitio de unión a epítipo específicos para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86,

CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC clase I o II de LAG-3, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *etc.*). En otra modalidad, los diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes, de la invención comprenden un sitio de unión a epítopo
 5 inmunospecífico para LAG-3, y tres sitios de unión a epítopo específico para un segundo epítopo (*por ejemplo*, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC clase I o II de LAG-3, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *etc.*).

10 **3. Moléculas de Unión Trivalente Biespecíficas que Contienen Regiones Fc**

[00193] Una modalidad adicional de la presente invención se relaciona con moléculas de unión trivalentes, biespecíficas, que comprenden una Región Fc, y son capaces de unirse
 15 simultáneamente a un primer epítopo, un segundo epítopo y un tercer epítopo, en donde al menos uno de tales epítopos no es idéntico a otro de tales epítopos. Tales diacuerpos biespecíficos de este modo comprenden dominios "VL1" / "VH1" que son capaces de unirse al primer epítopo, dominios "VL2"
 20 / "VH2" que son capaces de unirse al segundo epítopo, y dominios "VL3" / "VH3" que son capaces de unirse al tercer epítopo. En una modalidad, uno o dos de tales epítopos es un epítopo de LAG-3 y otro (o el otro) de tales epítopos no es un epítopo de LAG-3 (*por ejemplo*, un epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3,
 25

MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Tales moléculas de unión trivalente biespecíficas comprenden tres sitios de unión a epítopo, dos de los cuales son dominios de unión de tipo diacuerpo, que proporcionan un Sitio A de unión y un Sitio B de unión, y uno de los cuales es un dominio de unión de tipo no diacuerpo, que proporciona un Sitio C de unión (véase, *por ejemplo*, **Figuras 6A-6F**, y Publicación PCT No: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076).

[00194] De forma típica, las moléculas de unión trivalente de la presente invención comprenderán cuatro cadenas diferentes de polipéptidos (véase **Figuras 6A-6B**), sin embargo, las moléculas pueden comprender números menores o mayores de cadenas de polipéptidos, por ejemplo, al fusionar tales cadenas de polipéptidos entre sí (*por ejemplo*, mediante un enlace de péptido) o al "dividir" tales cadenas de polipéptidos para formar cadenas adicionales de polipéptidos, o al asociar cadenas adicionales o pocas de polipéptidos mediante enlaces disulfuro. Las **Figuras 6B-6F** ilustran este aspecto de la presente invención al representar esquemáticamente tales moléculas que tienen tres cadenas de polipéptidos. Como se proporciona en las **Figuras 6A-6F**, las moléculas de unión trivalente de la presente invención pueden tener orientaciones alternativas en las que los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminal (**Figuras 6A, 6C y 6D**) o C-terminal (**Figuras 6B, 6E y 6F**) en una Región Fc.

[00195] En ciertas modalidades, la primera cadena de polipéptidos de tales moléculas de unión trivalente de la presente invención contiene: (I) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2, (iii) un Dominio de Promoción de Heterodímero y (iv) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. Los Dominios VL1 y VL2 se ubican N-terminal o C-terminal en el dominio que contiene CH2-CH3 como se presenta en la **Tabla 5 (Figuras 6A y 6B)**. La segunda cadena de polipéptidos de tales modalidades contiene: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1, y (iii) un Dominio de Promoción de Heterodímero. La tercera cadena de polipéptidos de tales modalidades contiene: (i) un Dominio que contiene VH3, (ii) un Dominio que contiene CH1 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La tercera cadena de polipéptidos puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene un VH3 y un región constante de cadena pesada. El cuarto polipéptido de tales modalidades contiene: (i) un Dominio que contiene VL3, y (ii) un Dominio que contiene CL. La cuarta cadena de polipéptidos puede ser la cadena ligera de un anticuerpo que contiene un VL3 complementario al VH3 de la tercera cadena de polipéptidos. La tercera o cuarta cadena de polipéptidos puede aislarse de los anticuerpos que se producen de forma natural. Alternativamente, pueden construirse de forma recombinante, sintética o por otros medios.

[00196] El Dominio de Cadena Ligera Variable de la primera y segunda cadena de polipéptidos se separa de los Dominios de Cadena Pesada Variable de tales cadenas de polipéptidos por un conector separador de intervención que tiene una longitud que es demasiado corta para permitir que sus dominios VL1/VH2 (o sus VL2/VH1) se asocien juntos para formar un sitio de unión a epítipo capaz de unirse a cualquiera del primero o segundo epítipo. Un péptido separador preferido de intervención (conector 1), para este propósito, tiene la secuencia (**SEQ ID NO:14**): GGGSGGGG. Otros Dominios de las moléculas de unión trivalente pueden separarse por uno o más péptidos separadores de intervención, que comprenden de forma opcional un residuo de cisteína. Los conectores ejemplares útiles para la generación de moléculas de unión trivalente se proporcionan en la presente y también se proporcionan en la Solicitud de PCT Números: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076. De este modo, la primera y segunda cadena de polipéptidos de tales moléculas de unión trivalente se asocian juntas para formar un sitio de unión a VL1/VH1 capaz de unirse a un primer epítipo, así como un sitio de unión a VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítipo. La tercera y cuarta cadena de polipéptidos de tales moléculas de unión trivalente se asocian juntas para formar un sitio de unión a VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítipo.

[00197] Como se describe en lo anterior, las moléculas de

unión trivalente de la presente invención pueden comprender tres polipéptidos. Las moléculas de unión trivalente que comprenden tres cadenas de polipéptidos pueden obtenerse al enlazar los dominios del N-terminal del cuarto polipéptido

5 al Dominio que contiene VH3 del tercer polipéptido. Alternativamente, se utiliza una tercera cadena de polipéptidos de un molécula de unión trivalente de la invención que contiene los tres dominios: (i) un Dominio que contiene VL3, (ii) un Dominio que contiene VH3, y (iii) un

10 Dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, en donde los VL3 y VH3 se separan entre sí por un péptido separador de intervención que es suficientemente largo (al menos 9 o más residuos de aminoácidos) para permitir la asociación de estos dominios para formar un sitio de unión a epítipo.

15 **[00198]** Se entenderá que los Dominios VL1/VH1, VL2/VH2, y VL3/VH3 de tales moléculas de diacuerpo pueden ser los mismos o diferentes para permitir la unión que es monoespecífica, biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan de

20 preferencia para unirse a LAG-3 y un segundo epítipo (o un segundo y un tercer epítipo (de preferencia, tales epítopos son epítopos de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.)).

25 **[00199]** En particular, los Dominios VL y VH pueden

seleccionarse de modo que una molécula de unión trivalente comprende dos sitios de unión para un primer epítipo y un sitio de unión para un segundo epítipo, o un sitio de unión para un primer epítipo y dos sitios de unión para un segundo epítipo, o un sitio de unión para un primer epítipo, un sitio de unión para un segundo epítipo y un sitio de unión para un tercer epítipo. La estructura general de las cadenas de polipéptidos de las moléculas de unión trivalente representativas de la invención se proporcionan en las

5

10 **Figuras 6A-6F** y en la **Tabla 5**:

Tabla 5		
1 ^a Orientación de la Cuarta Cadena	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VH3-CH1-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	4 ^a Cadena	NH ₂ -VL3-CL-COOH
2 ^a Orientación de la Cuarta Cadena	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD- COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VH3-CH1-CH ₂ -CH ₃ -COOH

	4 ^a Cadena	NH ₂ -VL3-CL-COOH
1 ^a Orientación de la Tercera Cadena	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
2 ^a Orientación de la Tercera Cadena	2 ^a Cadena	NH ₂ -VL2-VH1- HPD-COOH
	1 ^a Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD COOH
	3 ^a Cadena	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH

HPD = Dominio de Promoción de Heterodímero

[00200] Una modalidad de la presente invención se relaciona con moléculas de unión trivalente biespecíficas que comprenden dos sitios de unión a epítipo para LAG-3 y un sitio

5 de unión a epítipo para el segundo epítipo presente en una molécula distinta de LAG-3 (*por ejemplo* B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *etc.*). Los dos sitios de unión a v para LAG-3 pueden unir el mismo epítipo o epítopos

10 diferentes. Otra modalidad de la presente invención se relaciona con moléculas de unión trivalente biespecíficas que

comprenden, un sitio de unión a epítopo para LAG-3 y dos sitios de unión a epítopo que unen un segundo antígeno presente en una molécula distinta de LAG-3 (*por ejemplo* B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *etc.*). Los dos sitios de unión a epítopo para el segundo antígeno pueden unirse al mismo epítopo o a epítopos diferentes del antígeno (*por ejemplo*, los mismos o diferentes epítopos de LAG-3). Como se proporciona en lo anterior, tales moléculas de unión trivalente biespecíficas pueden comprender tres o cuatro cadenas de polipéptidos.

VII. Dominios Constantes y Regiones Fc

[00201] En la presente se proporcionan Dominios Constantes de anticuerpo útiles en la generación de moléculas de unión a LAG-3 (*por ejemplo*, anticuerpos, diacuerpos, moléculas de unión trivalente, *etc.*) de la invención.

[00202] Un Dominio CL preferido es un Dominio Kappa de IgG de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio Kappa Cl de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:118**):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

[00203] Alternativamente, un Dominio CL ejemplar es un Dominio Lambda CL de IgG de humano. La secuencia de

aminoácidos de un Dominio Kappa C1 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:119**):

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
5 TECS

[00204] Como se proporciona en la presente, las moléculas de unión a LAG-3 de la invención pueden comprender una Región Fc. La Región Fc de tales moléculas de la invención puede ser cualquier isotipo (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4).
10 Las moléculas de unión a LAG-3 de la invención además pueden comprender un Dominio CH1 y/o una región bisagra. Cuando se encuentra presente, el Dominio CH1 y/o la región bisagra puede ser de cualquier isotipo (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4), y de preferencia es del mismo isotipo como la Región
15 Fc deseada.

[00205] Un Dominio CH1 ejemplar es un Dominio CH de IgG1 de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio CH1 de IgG1 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:120**):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
20 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

[00206] Un Dominio CH1 ejemplar es un Dominio CH de IgG2 de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio CH1 de IgG2 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:121**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
25 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

[00207] Un Dominio CH1 ejemplar es un Dominio CH1 de IgG4 de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio CH1 de IgG4 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:122**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 5 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

[00208] Una región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG1 de humano. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:114**): EPKSCDKTHTCPPCP.

10 **[00209]** Otra región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG2 de humano. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG2 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:115**): ERKCCVECPPCP.

[00210] Otra región bisagra ejemplar es una región bisagra
 15 de IgG4 de humano. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:116**): ESKYGPPCPSCP. Como se describe en la presente, una región bisagra de IgG4 puede comprender una mutación de estabilización tal como la sustitución S228P. La secuencia
 20 de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 estabilizada ejemplar es (**SEQ ID NO:117**): ESKYGPPCPPCP.

[00211] La Región Fc de las moléculas que contienen Región Fc (*por ejemplo*, anticuerpos, diacuerpos, y moléculas trivalentes) de la presente invención pueden ser una Región
 25 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 las moléculas que contienen Región Fc de la presente invención carece del residuo de aminoácidos de lisina de C-terminal. En particular, la Región Fc de las moléculas que contienen Región Fc de la presente invención puede ser una Región Fc variante diseñada. Aunque la Región Fc de las moléculas 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 las moléculas 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.).

5 **[00212]** 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. 10 (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 15 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 20 subcombinación. En una modalidad, la Región Fc variante de 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.

25 **[00213]** En particular, se prefiere que los Dominios CH2-CH3

de las cadenas de polipéptidos de las moléculas 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 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, la moléculas que contienen Región Fc de la presente invención comprenden una Región Fc de IgG que muestra función efectora de ADCC reducida. 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 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 Región Fc de IgG1 en estado natural (**SEQ ID NO:1**)). En una modalidad específica, las moléculas que contienen Región Fc de la presente invención comprenden una Región Fc de IgG2

(**SEQ ID NO:2**) o una Región Fc de IgG4 (**SEQ ID:NO:4**). Cuando se utiliza una Región de Fc de IgG4, la presente invención también abarca la introducción de una mutación de estabilización, tal como la sustitución de la región S228P de bisagra descrita en lo anterior (véase, por ejemplo, **SEQ ID NO:117**). Puesto que las sustituciones de N297G, N297Q, L234A, L235A y D265A suprime la función efectora, en circunstancias en la cuales se desea una función efectora, sería preferible que no se emplearan estas sustituciones.

10 **[00214]** Una secuencia IgG1 preferida para los Dominios CH2 y CH3 de las moléculas de unión a LAG-3 de la invención tendrá las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:123**):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 15 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde, **X** es una lisina (K) o se encuentra ausente.

[00215] En particular, se prefiere por las Regiones de Fc de las cadenas de polipéptido de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención muestre una vida media de suero incrementada (en relación con la vida media mostrada por el Fc de tipo silvestre correspondiente). Se describen en lo anterior Regiones de Fc Variantes y formas mutantes que
 20 muestran la vida media de suero extendida. En una modalidad
 25

preferida el Dominio CH2-CH3 de la primer y/o tercera cadenas de polipéptidos de tales moléculas que contienen la Región de Fc incluye cualquiera de 1, 2, o 3, de las sustituciones: M252Y; S254T y T256E. Esta invención abarca adicionalmente
 5 moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención comprenden Regiones de Fc variantes que comprenden:

(A) una o más mutaciones que alteran la función efectora y/o FcγR; y

(B) una o más mutaciones que extienden la vida media
 10 del suero.

[00216] Una secuencia IgG1 preferida para los Dominios CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención comprenderá las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:124**):

15 APE~~AA~~GGPSV FLFPPKPKDT ~~LYITRE~~PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LSLSPG~~X~~

20 en donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

[00217] Una secuencia IgG4 preferida para los Dominios CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención comprenderá las sustituciones M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:125**):

25 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT ~~LYITRE~~PEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

5 en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente

[00218] Para diacuerpos y moléculas de unión trivalentes
 cuyas primera y tercera cadenas no son idénticas), es deseable
 reducir o evitar que ocurra la homodimerización entre los
 Dominios de CH₂-CH₃ de dos primeras cadenas de polipéptidos o
 10 entre los Dominios CH₂-CH₃ de dos terceras cadenas de
 polipéptidos. Los Dominios de CH₂ y/o CH₃ de tales cadenas de
 polipéptidos no necesitan ser idénticas en secuencia, y se
 modifican ventajosamente para fomentar la complejación entre
 las dos cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, una sustitución
 15 de aminoácidos (de preferencia una sustitución con un
 aminoácidos que comprende un grupo lateral voluminoso que
 forma una "protuberancia", *por ejemplo*, triptófano) puede
 introducirse en el Dominio de CH₂ o CH₃ de tal manera que la
 interferencia estérica evitará la interacción con un dominio
 20 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
 sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones
 pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que
 25 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-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 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 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 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 homodimerización con sí misma. Esta estrategia puede

utilizarse para diacuerpos y moléculas de unión trivalentes que comprenden tres, cuatro o cinco cadenas como se detalla en lo anterior, donde la "protuberancia" se diseña en los Dominios CH2-CH3 de la primera cadena de polipéptidos y el
5 "agujero" se diseña en los Dominios CH2-CH3 de la tercera cadena de polipéptidos.

[00219] 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
10 de 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. En una modalidad alternativa, la tercera cadena de polipéptidos que porta el agujero puede incorporar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 434 y 435 (N434A/N435K).

25 **[00220]** Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para

los Dominios CH2 y CH3 de la primera cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc de la presente invención tendrá la secuencia **"que porta la protuberancia"** (**SEQ ID NO:126**) :

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

10 en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente

[00221] Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los Dominios CH2 y CH3 de la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc de la presente invención que tiene dos cadenas de polipéptidos (o la tercera

15 cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc que tiene tres, cuatro, o cinco cadenas de polipéptido) tendrá la secuencia **"que porta el agujero"** (**SEQ ID NO:127**) :

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

en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente

[00222] Como se observará, los Dominios CH2-CH3 de la **SEQ ID NO:126** y la **SEQ ID NO:127** incluyen una sustitución en la

25

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
5 relación con la unión mostrada por la región Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO:1**). La invención también abarca tales Dominios CH2-CH3, los cuales comprenden residuos de alanina en las posiciones 234 y/o 235 y/o sustituciones alternativas y/o adicionales las cuales modifican la función efectora y/o
10 la actividad de unión de FcγR de la Región de Fc. La invención también abarca tales Dominios CH2-CH3, que comprende además una o más sustituciones de aminoácidos que extienden la vida media. En particular, la invención abarca tales dominios que porta el agujero y que porta la protuberancia de los Dominios
15 CH2-CH3 que comprende además la M252Y/S254T/T256E.

[00223] 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:126**. Sin embargo, se reconocerá, un Dominio CH2-CH3 "que porta el
20 agujero" (por ejemplo, **SEQ ID NO:127**) podría emplearse en la primera cadena de polipéptidos, en cuyo caso, un Dominio CH2-CH3 "que porta la protuberancia" (por ejemplo, **SEQ ID NO:126**) puede emplearse en la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc de la presente invención
25 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).

[00224] Como se detalla en lo anterior la invención abarca las moléculas que contienen la Región de Fc (*por ejemplo,*
5 anticuerpos y diacuerpos que contienen la Región de Fc) que tienen Dominios CH2 y CH3 de tipo silvestre, o que tienen Dominios CH2 y CH3 que comprenden combinaciones de las sustituciones descritas en lo anterior. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de un Dominio de CH2-CH3 de IgG1 abarca
10 que abarca tales variaciones es (**SEQ ID NO:128**):

APEX ₁ X ₂ GGPSV	FLFPPKPKDT	LX ₃ IX ₄ RX ₅ PEVT	CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT
LPPSREEMTK	NQVSLX ₆ CX ₇ VK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN
15 YKTTTPVLDS	DGSFFLX ₈ SKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE
ALHX ₉ X ₁₀ YTQKS	LSLSPGX ₁₁		

en donde:

- (a) X₁ y X₂ son ambos L (de tipo silvestre), o son ambos A (unión de FcγR disminuida);
- 20 (b) X₃, X₄, y X₅ respectivamente son M, S y T (de tipo silvestre), o son Y, T y E (de vida media extendida),
- (c) X₆, X₇, y X₈ respectivamente son T, L e Y (de tipo silvestre), o son W, L e Y (protuberancia), o S, A
25 y V (agujero);

(d) X_9 y X_{10} respectivamente son N y H (de tipo silvestre), o son N y R (sin unión de proteína A), o A y K (sin unión de proteína A); y

(e) X_{11} es K o se encuentra ausente

5 **[00225]** En otras modalidades, la invención abarca las moléculas de unión a LAG-3 que comprende los Dominios de CH2 y/o CH3 que se han diseñado para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización utilizando mutaciones conocidas en la técnica, tales como aquellas
10 descritas en la Publicación PCT No. WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, todas de las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

15 **VIII. Anticuerpos de Referencia**

A. Anticuerpo Anti-LAG-3 de Referencia

[00226] Con el fin de evaluar y caracterizar las moléculas de unión anti-LAG-3 novedosas de la presente invención, se empleó el siguiente anticuerpo de referencia: **25F7** (BMS-
20 986016, Medarex/BMS, designada en la presente como "**mAb A de LAG-3**").

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

[00227] La secuencia de aminoácidos del Domino VH de **25F7** ("**mAb A de LAG-3**") (**SEQ ID NO:129**) se muestra en lo siguiente
25 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHGNTNSN PSLKSRVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

[00228] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de
 5 **25F7** ("**LAG-3 mAb A**") (**SEQ ID NO:130**) se muestra en lo
 siguiente (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIK

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

[00229] Con el fin de evaluar y caracterizar la actividad de
 las moléculas de unión de LAG-3 novedosas de la presente
 invención en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 puede
 utilizarse un anticuerpo de referencia. Se conocen
 15 anticuerpos que son inmunoespecíficos 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
 20 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
 25 (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")

5 [00230] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de mAb 1 de PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:131) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
10 IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTlVT VSS

[00231] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de mAb 1 de PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:132) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

15 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIK

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

[00232] 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 subrayados):

25 QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG

INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

[00233] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 2 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:134**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados) :

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGTKVEIK

10

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

[00234] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 3 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:135**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados) :

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRWR
DSSGYHAMDY WGQGTSTVTVSS

[00235] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 3 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:136**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados) :

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

25

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

[00236] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 4 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:137**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

10 [00237] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 4 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:138**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQKPG KAPKLWIYRT
 15 SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQOR SSFPLTFGGG
 TKLEIK

IX. Métodos de Producción

[00238] Un polipéptido anti-LAG-3, y otros agonistas, antagonistas y moduladores de LAG-3 pueden crearse a partir 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.
 20
 25 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
5 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,
10 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).

[00239] Los polipéptidos de la invención pueden prepararse convenientemente utilizando síntesis de péptido de fase
15 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 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
20 Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

[00240] En aún otra alternativa, los anticuerpos completamente humanos que tienen uno o más de los CDR de mAb
25 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-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
5 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
10 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).

[00241] En una alternativa, los anticuerpos pueden
15 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
20 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
25 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 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*," Annu. Rev. Immunol. 12.433-455).

15 **[00242]** 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 espectrometría de masa o degradación de Edman pueden

20 utilizarse para diseñar las ondas o cebadores que se utilizan para clonar la proteína de interés.

[00243] Un método alternativo para clonar la proteína de interés es por "toma panorámica" utilizando LAG-3 purificado o porciones del mismo para células que expresan un anticuerpo

25 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.

5 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

10 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

15 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

20 Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," Endocrinol. 140:5841-5854).

[00244] Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un número de medios apropiados, incluyendo

25 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.

[00245] 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.

[00246] La invención incluye polipéptidos que comprenden una
secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de esta
invención. Los polipéptidos de esta invención pueden
25 elaborarse por procedimientos conocidos en la técnica. Los

polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, por métodos recombinantes (es decir, 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 5 aproximadamente 50 aminoácidos, se elaboran convenientemente por síntesis química. Los métodos de síntesis química se conocen en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles. Por ejemplo, un polipéptido anti-LAG-3 podría 10 producirse por un sintetizador de polipéptido automatizado que emplea el método de fase sólida.

[00247] La invención incluye variantes de 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 y sus fragmentos de 15 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 así como también variantes que tienen actividad mejorada o disminuida. La modificación de polipéptidos es de rutina 20 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 25 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; aspartic acid/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 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.

[00248] La invención abarca proteínas de fusión que
5 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
comprende una cadena ligera, una cadena pesada o ambas de una
10 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
Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo producido a partir
15 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
20 o una secuencia homologa a partir de otra región.

X. Usos de las Moléculas de Unión a LAG-3 de la Presente Invención

[00249] La presente invención abarca composiciones, que
25 incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden las

moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención (*por ejemplo*, anticuerpos anti-LAG-3, diacuerpos biespecíficos anti-LAG-3, *etc.*), los polipéptidos derivados de tales moléculas, los polinucleótidos que comprenden secuencias que
5 codifican tales moléculas o polipéptidos, y otros agentes como se describe en la presente.

[00250] 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
10 de la presente invención tienen la capacidad de inhibir la función de LAG-3, y de esta manera invierten la inhibición 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
15 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.

20 **[00251]** 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
25 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

5 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 protozooario).

10 **[00252]** 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

15 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 cáncer de mama, unos tumores de cuerpo carótido, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de

20 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 redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Erwing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, una fibrogenesis

25 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 germinal, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un Sarcoma
5 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, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome
10 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,
15 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
20 carcinoma tímico, un timoma, un cáncer de tiroides metastásico, y un cáncer uterino.

[00253] 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
25 de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga,

neuroblastoma; sarcoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y cáncer rectal.

[00254] Los trastornos asociados con patógenos que pueden
 5 tratarse por las moléculas de unión a LAG-3 de la presente
 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
 10 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*,
Diphtheria, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*,
 15 *Klebsiella*, *Legionella*, *Meningococci*, *mycobacteria*,
Pseudomonas, *Pneumococci*, *rickettsia bacteria*, *Salmonella*,
Serratia, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus*
 (*A. fumigatus*, *A. niger*, etc.), *Blastomyces dermatitidis*,
Candida (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*,
 20 etc.), *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (*mucor*,
absidia, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Paracoccidioides*
brasiliensis, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*,
Leptospirosis, *Borrelia burgdorferi*, parásitos helminto
 (anquilostoma, tenias, trematodos, gusanos planos (por
 25 ejemplo *Schistosomia*), *Giardia lamblia*, *trichinella*,

Dientamoeba Fragilis, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, y Leishmania donovani.

[00255] Las moléculas de unión a LAG-3 de la invención pueden combinarse con un agente inmunogénico tal como vacuna para
 5 tumores. Tales vacunas pueden comprender antígenos para tumor
 purificado (que incluye proteínas recombinantes, péptidos, y
 moléculas de carbohidrato), células tumorales autólogas o
 alogénicas. Una serie de estrategias de vacuna para tumores
 se han descrito (véase por ejemplo, Palena, C., et al., (2006)
 10 "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,"
 15 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
 20 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)
 25 "Realization Of The Therapeutic Potential Of CTLA-4 Blockade

In Low-Dose Chemotherapy-Treated Tumor-Bearing Mice", Cancer Research 58: 5301-5304).

[00256] 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*
 5 *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
 10 164:2160-2169; 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:
 15 263-266; 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
 20 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)
 25 "*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): 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 Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo", Leukemia 28(8):1596-1605).

[00257] 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 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 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).

[00258] 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.

- 5 **[00259]** 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 **XI. Composiciones Farmacéuticas**

- [00260]** 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
15 *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
20 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
25 farmacéuticamente aceptable. La invención abarca

particularmente tales composiciones farmacéuticas en las 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 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 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.

[00261] 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.

[00262] En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o un estado o listado 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

5 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

10 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

15 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,

20 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.

25 **[00263]** 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
5 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
10 inyección o solución salina puede proporcionarse de modo que
los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00264] Las composiciones de la invención pueden formularse
como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente
aceptables incluyen, pero no se limitan a aquellas formadas
15 con aniones tales como aquellas derivadas de ácidos
clorhídrico, forfórico, 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
20 procaina etc.

[00265] 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
25 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 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 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 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.

[00266] 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.

15 XII. Métodos de Administración

[00267] Las composiciones de la presente invención pueden 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 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 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.

[00268] 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 construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, *etc.*

[00269] Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (*por ejemplo*, intradérmica, intramuscular, 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 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.

5 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; 10 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 se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

[00270] La invención también proporciona que las moléculas 15 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 modalidad, tales moléculas se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en 20 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, las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un 25 recipiente herméticamente sellado.

[00271] Las moléculas de unión a LAG-3 de la presente invención deben almacenarse entre 2°C y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de 12 horas, de preferencia dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, 5 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 10 preferencia, tales moléculas de unión a LAG-3 cuando se proporcionan en forma líquida se suministran en un recipiente herméticamente sellado.

[00272] La cantidad de la composición de la invención la cual será efectiva en el tratamiento, prevención o mejora de 15 uno o más síntomas asociados con un trastorno pueden 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 20 de las circunstancias del paciente. La dosis efectiva puede extrapolarse a través de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba in vitro o de modelo animal.

[00273] Como se utiliza en la presente, una "**cantidad efectiva**" de una composición farmacéutica en una modalidad, 25 es una cantidad suficiente para efectuar resultados benéficos

o deseados que incluyen, sin limitación, resultados clínicos tales como reducir los síntomas que resultan de la enfermedad atenuando un síntoma de la infección (por ejemplo carga viral, fiebre, dolor, sepsis, etc.) o un síntoma de cáncer (por ejemplo, la proliferación, de células cancerígenas, presencia de tumor, metástasis de tumor, etc.), por lo que incrementa la calidad de vida de aquellos que sufren de la enfermedad, disminuyendo la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otro medicamento tal como mediante la selección y/o internalización, retrasando la progresión de la enfermedad y/o prolongando la supervivencia de los individuos.

[00274] Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una cantidad efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la proliferación de (o el efecto de) la presencia viral y para reducir y/o retardar el desarrollo de la enfermedad viral, ya sea directa o indirectamente. En algunas modalidades, una cantidad efectiva de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede o no lograrse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De este modo, una "cantidad efectiva" puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes quimioterapéuticos, y un agente simple puede considerarse que se da en una cantidad efectiva

sí, junto con uno o más de otros agentes, puede existir o se logra un resultado deseable. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los márgenes de cantidades efectivas de cada componente se encuentran dentro
5 de la experiencia de la técnica.

[00275] Para moléculas de unión a LAG-3 abarcadas por la invención (por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos, etc.), la dosis administrada a un paciente se determina de preferencia basado en el peso corporal (kg) del sujeto receptor. Para las
10 moléculas de unión a LAG-3 abarcadas por la invención, la dosis administrada a un paciente 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
15 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
20 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
25 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, 5 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 10 referencia o el peso de meseta establecido debe impulsar volver a realizar el cálculo de la dosis.

[00276] En algunas modalidades, las moléculas biespecíficas de unión a LAG-3 (por ejemplo, diacuerpos y moléculas de unión trivalentes) abarcadas por la invención, la dosis 15 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 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 20 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 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 25

menos alrededor de 400 ng/kg por día a alrededor de 800 ng/kg por día, de al 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
5 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 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
10 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.

15 **[00277]** En otra modalidad, se administra al paciente un 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
20 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En ciertas 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
25 el día 1, día 2, día 3 y día 4 de una semana determinada y

no 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, 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.

[00278] 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 6** proporciona 5 ejemplos de regímenes de dosificación diferentes descritos en lo anterior para un curso típico de tratamiento con un

5 diacuerpo.

Tabla 6						
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

[00279] 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.

[00280] 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, 5 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.

[00281] Las composiciones farmacéuticas de la invención 10 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 poroso gelatinoso, que incluye membranas, tales como 15 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.

[00282] Las composiciones de la invención pueden 20 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 (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, 25 ibid., pp. 3 17-327).

[00283] 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

5 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

10 *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)

15 "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.*

20 *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;

25 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 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);

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)

"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 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), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico) poliglicólicos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinyl
5 pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólicos), (PLGA), y poliortoésteres. Un sistema de liberación controlada puede colocarse en proximidad del objeto terapéutico (*por ejemplo*, los pulmones) de este modo
10 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 composiciones poliméricas útiles como implante de liberación controlada pueden utilizarse de acuerdo con Dunn *et al.* (Véase
15 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 puede ocurrir generalmente en cualquier lado dentro del cuerpo del paciente en necesidad del tratamiento terapéutico. Puede
20 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
25 desde la composición hacia el fluido de tejido circundante,

y el material no polimérico se coagulara gradualmente o se precipitará para formar una matriz microporosa sólida (Véase U.S. 5,888,533).

[00284] Los sistemas de liberación controladas se discuten en la revisión por Langer (1990, "New Methods Of Drug 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. 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 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.

[00285] 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 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 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 *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.

20 **[00286]** 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 tratamiento simple o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata

25 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
5 administrarse una vez al día, dos veces al día, o 3 veces al día. Alternativamente, la composición farmacéutica puede 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
10 se apreciara que la dosis efectiva de las moléculas utilizadas para el tratamiento pueden incrementar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular.

Ejemplos:

15 **[00287]** 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.
20 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.

25 **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.**

[00288] Los anticuerpos monoclonales de 6 murinos se
5 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
10 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
15 de hLAG-3", "VL-3 de mAb 1 de hLAG-3" y "VL-4 de mAb 1 de
hLAG-3"**. El mAb 6 de LAG-3 que también se humanizo produjo
dos dominios de VH humanizados, designados en la presente
como **"VH-1 de mAb 6 de hLAG-3" y "VH-2 de mAb 6 de hLAG-3"** y
dos dominios de VL humanizados designado en la presente como
20 **"VL-1 de mAb 6 de hLAG-3", y "VL-2 de mAb 6 de hLAG-3"**. como
se proporciona en lo anterior, los dominios variables pesados
y ligeros humanizados de un anticuerpo dado puede utilizarse
en cualquier combinación y combinaciones particulares de
dominios de variable humanizados se denominan por referencia
25 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.**"

[00289] Se construyeron mAbs humanizados de longitud completa como sigue: el C-termino de un dominio de VL humanizado se fusionó al N-término de una región capa de cadena ligera humana para generar una cadena ligera y cada cadena ligera se aparea con una cadena pesada que comprende un dominio de VH humanizado del mismo anticuerpo fusionado al N-termino de cualquiera de una región constante de IgG1 humano que comprende las sustituciones de L234A/L235A (AA) o una región constante de IgG4 humana que comprende la sustitución de S228P.

[00290] La secuencia de amino ácidos de una región constante de IgG1 humano ejemplar comprende las sustituciones de L234A/L235A (AA) (**SEQ ID NO:139**):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPE**AA**GG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
20 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG**X**

en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente

[00291] En la **SEQ ID NO:139**, los residuos de aminoácidos 1-

98 corresponden al dominio de CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO:120**), los residuos de amino ácidos 99-113 que corresponden a la región de bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 114**) y los residuos de aminoácidos 114-329 corresponden al dominio de CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones de L234A/L235A (subrayadas) (**SEQ ID NO:123**).

[00292] La secuencia de amino ácidos de una región constante de IgG4 humana ejemplar que comprende la sustitución de S228P (**SEQ ID NO:140**):

```

10  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
    HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
    KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
    PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
    CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
15  GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
    NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente

[00293] En la **SEQ ID NO:140**, los residuos de aminoácidos 1-98 corresponden al dominio de CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO:122**), los residuos de amino ácidos 99-110 corresponden a la región de bisagra de IgG4 estabilizada que comprende las sustituciones de S228P (subrayadas) (**SEQ ID NO: 117**) y los residuos de aminoácidos 111-326 corresponden al dominio de CH2-CH3 de IgG4 (**SEQ ID NO:4**).

[00294] 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 7**.

Tabla 7			
Anticuerpo Anti-LAG-3	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)
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	16	0.59	0.04

hLAG-3			
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)

[00295] En estudios adicionales, la cinética de unión de mAb 1 (1.4) de hLAG-3 de anticuerpos humanizados y mAb 6 (1.1) de hLAG-3, y un anticuerpo de referencia mAb A de LAG-3 tanto en LAG-3 humano y de mono cynomolgus se investigó utilizando el análisis Biacore. En estos estudios, una proteína de fusión de LAG-3 soluble (el dominio extracelular del LAG-3 humano o de mono cynomolgus fusionado a IgG2a de murino) se capturó en una superficie de Fc de anti ratón de cabra Fab2 y se incubo con el anticuerpo anti-LAG-3 y la cinética de unión se determinó mediante el análisis Biacore. Las curvas de unión para mAb A de LAG-3, mAb 1 (1.4) de hLAG-3 y mAb 6 (1.1) de hLAG-3 que se une al LAG-3 de mono cynomolgus se muestra en la **Figures 7A-7C** respectivamente, y los k_a , k_d y K_D calculados se presentan en la **Tabla 8**. En un estudio separado, la unión de un diacuerpo que contiene la región FC biespecífica comprende mAb 6 (1.1) de hLAG-3 tanto para LAG-3 humano como

de mono cynomolgus se investigó utilizando el análisis Biacore. En este estudio, el diacuerpo que contiene mAb 6 (1.1) de hLAG-3 se capturo en una superficie de Fc anti humano de cabra Fab₂ y se incubo con proteína de fusión de LAG-3 soluble (el dominio extracelular del LAG-3 humano o de mono cynomolgus fusionado a la etiqueta His) y la cinética de unión se determinó mediante el análisis de Biacore. Los ka, kd y KD calculados se presentaron en la **Tabla 8**.

Tabla 8						
Anticuerpo Anti- LAG-3	Humano			Mono Cynomolgus		
	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-5}$)	KD (nM)	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-5}$)	KD (nM)
mAb A de LAG-3	6.2	1.0	0.16	2.4	1100	458
mAb 1 (1.4) ^a de hLAG-3	3.4	<1.0	<0.2 9	1.9	<1.0	<0.5 3
mAb 6 (1.1) ^a de hLAG-3	9.9	<1.0	<0.1	8.2	30	3.7
mAb 6 (1.1) ^b de hLAG-3	480	16	0.03 3	59	78	0.13

a = proteína de fusión de IgG2a de murino-LAG-3 de humano
o cynomolgus inmovilizada

b = diacuerpo que contiene la Región Fc inmovilizada que comprende un dominio de unión de epítipo mAb 6 (1.1) de hLAG-3

[00296] 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
5 con LAG-3 de mono cynomolgus.

[00297] 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 los anticuerpos se unen a diferentes epítopos de LAG-3, se
10 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 activaron con una inyección de una solución que contiene N-etilo-N-(dietilamino-propil)carbodimida 0.2 M y N-hidroxisuccinimida 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, seguido por etanolamina 1 M para desactivación de los grupos
20 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
25 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 las mismas condiciones. Las respuestas de unión del anticuerpo de competencia se comparó con su respuesta de unión
5 al hLAG-3-His preinyectado con el regulador para identificar anticuerpos que compiten por el mismo epítipo. La 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
10 analitos sobre la superficie tratada con proteína no inmovilizada. Las curvas de unión se generaron por el software BIAevaluation v4.1 de dato de sensograma en tiempo real.

[00298] Los resultados de este experimento se muestran en las **Figuras 8A-8D**. Los resultados del experimento indican que
15 el mAb A de LAG-3 de anticuerpo biotinilado fue capaz de unirse a 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
20 mostraron que mAb 1 de LAG-3 y mAb 6 de LAG-3 probablemente se unen al mismo, o se 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.

25 **[00299]** 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 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 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 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 lo anterior. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 9A** y la **Figura 9B**.

[00300] 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
 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,
 10 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 las **Figuras**
 15 **10A-10C**, respectivamente.

[00301] Los resultados de este ensayo de inhibición (**Figuras 9A-9B** y **Figuras 10A-10C**) 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.

20

Ejemplo 2: Metodología de Citometría de Flujo

[00302] 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
 25 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 5 3DS223H] anti-PD-1 de picoeritritina (PE)-conjugado [clon EH12.2H7] o alofococianina (APC)-conjugada (eBiosciences o BioLegend)) y los controles de isotipo apropiados. Todos los anticuerpos se utilizaron en las concentraciones recomendadas por el fabricante. Las tinción celular se realizó en el 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 un citómetro de flujo. Para excluir las células muertas, todas las muestras 15 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 20 utilizando el Software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

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

25 **[00303]** La expresión de LAG-3 y la capacidad de los

anticuerpos de LAG-3 aislados para unir específicamente LAG-3 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, 5 las PBMCs se purificaron utilizando el método de configuración de gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE 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 10 utilizando el equipo de células T humanas intactas Dynabeads® (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 15 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) 20 se examinaron por citometría de flujo como se describe en lo anterior utilizando anti-LAG-3 PE-conjugado y anti-CD4 FITC-conjugado.

[00304] Los resultados de estos estudios se muestran en las **Figuras 11A-11C**. No se observó expresión de LAG-3 en células 25 T CD4+ intactas (**Figura 11A**). Sin embargo, las células T CD4+

estimuladas CD3/CD8 a partir de 2 donadores diferentes (D:58468 y D:43530) mostraron un incremento dramático en la expresión de LAG-3 (**Figuras 11B y 11C**).

[00305] La capacidad de mAb 1 de LAG-3 (**Figura 12, Panel A y D**), mAb 2 de LAG-3 (**Figuras 12, Panel B y E**), mAb 3 de LAG-3 (**Figura 12, Panel C y F**), mAb 4 de LAG-3 (**Figura 13, Panel A y C**), y mAb 5 de LAG-3 (**Figura 13, Panel B y D**), 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 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 las **Figuras 12, los Paneles A-F y la Figure 13, Paneles A-D**, cada uno de los anticuerpos anti-LAG-3 examinados se enlazan solamente para células T de CD4+ estimuladas, pero no intactas.

[00306] 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 específicamente se unen solo a las células T estimuladas.

Ejemplo 4: Actividad Funcional de Anticuerpos anti-LAG

[00307] *la enterotoxina de tipo B de Staphylococcus aureus (SEB) es un superantígeno microbiano capaz de activar*
5 *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 oligoclonales y producción de citosina (aunque
10 *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.

[00308] Los PBMCs purificados como se describe en lo anterior
se cultivaron en un medio de RPME y más 10% de FBS inactivado
15 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
20 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
25 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
 5 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.

[00309] Los resultados de citometría de flujo de dos
 10 donadores representativos (D:34765 y D:53724) se mostraron en la **Figura 14, Paneles A-D** (D:34765) y la **Figura 15, Paneles A-D** (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
 15 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 (se compara la **Figura 14, Paneles C y D**, y las **Figuras 15, Paneles C y D**).

[00310] 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,
 25 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
5 mejorar la liberación de citocina a través de la inhibición del punto de control se examinó.

[00311] 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
10 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
15 IL-4 (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las **Figuras 16A-16B** muestran IFN γ (**Figura 16A**) y TNF α (**Figura 16B**), 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
20 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 17** muestra los perfiles de secreción
25 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
5 utilizaron en 10 µg/ml.

[00312] 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 16A** y **Figura 17**), y de TNF α
10 (**Figura 16B**) 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
15 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 17**)
20 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.

Ejemplo 5: Unión al LAG-3 de Mono Cynomolgus Endógeno

[00313] La capacidad de mAb 6 (1.1) de hLAG-3 de anticuerpo humanizado, y el mAb A de LAG-3 anticuerpo de referencia para unir el LAG-3 endógeno expresado en los PBMC de mono
5 cynomolgus se investigó por FACS. Para este estudio los PBMC se aislaron de la sangre entera de mono cynomolgus donador y se cultivaron solos o con estimulación de SEB (500 ng/ml) esencialmente como se describe en lo anterior. En las células posteriores a la estimulación de SEB 66 horas (intacta y
10 estimulada) se tiñeron con los anticuerpos de mAb 6 (1.1) de hLAG-3, mAb A de LAG-3, o mAb 1 de PD-1 (10 veces las diluciones seriales). Los anticuerpos se detectaron con anticuerpo secundario etiquetado APC de Fc antihumana de cabra. La unión se representa en la **Figura 18A-18B** para dos
15 donadores mono cynomolgus.

[00314] La estimulación de SEB se confirmó por la expresión de PD-1 mejorada como se detecta con mAb 1 de PD-1 de anticuerpo anti-PD-1. Los resultados de estos estudios demostraron que mAb 6 (1.1) de hLAG-3 se une a LAG-3 endógeno
20 expresado en la superficie de los PBMC de mono cynomolgus.

[00315] 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
25 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.