

Brevetto europeo No. 2320940

Domanda di brevetto europeo No. 09807162.4

Data di deposito: 11 agosto 2009

Classificazione Internazionale: C12N5/16

5 Priorità: Statunitense No. 20080188548P del 11 agosto 2008

Titolo: ANTICORPI UMANI CHE LEGANO IL GENE DI ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI-3 (LAG-3) E LORO  
USI

Richiedente: E. R. Squibb & Sons, L.L.C.  
Route 206 and Province Line Road  
10 Princeton, NJ 08540  
U.S.A.

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

\*\*\*\*\*

Descrizione

20 Sfondo dell'invenzione

Il gene di attivazione dei linfociti-3, o LAG-3 (anche noto come CD223), è un membro della famiglia supergenica delle immunoglobuline, ed è strutturalmente e geneticamente correlato a CD4. LAG-3 non viene espresso sui linfociti del sangue periferico quiescenti, ma viene espresso sulle cellule T e sulle cellule NK attivate. LAG-3 è una proteina di membrana codificata da un gene ubicato sulla parte distale del braccio corto del cromosoma 12 in prossimità



del gene CD4, suggerendo che il gene LAG-3 possa essersi evoluto attraverso la duplicazione genica (Triebel et al. (1990) *J. Exp. Med.* 171:1393-1405).

È stato dimostrato che LAG-3, in maniera simile a CD4, interagisce con le molecole MHC di classe II ma, a differenza di CD4, LAG-3 non interagisce con la proteina gp120 del virus dell'immunodeficienza umana (Baixeras et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176:327-337). Adoperando una proteina di fusione LAG-3 solubile-immunoglobulina (sLAG-3Ig), degli studi hanno dimostrato un legame diretto e specifico di LAG-3 alle MHC di classe II sulla superficie delle cellule (Huard et al. (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:1180-1186).

In studi in vitro sulle risposte a cellule T antigene-specifiche, l'aggiunta di anticorpi anti-LAG-3 determinava un aumento della proliferazione delle cellule T, una maggiore espressione di antigeni di attivazione come CD25, e concentrazioni più alte di citochine come l'interferone-gamma e l'interleuchina-4, sostenendo un ruolo dell'interazione LAG/MHC di classe II nella sottoregolazione della stimolazione antigene-dipendente dei linfociti T CD4<sup>+</sup> (Huard et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:3216-3221). È stato dimostrato che la regione intra-citoplasmatica di LAG-3 interagisce con una proteina denominata LAP che, secondo quanto ritenuto, è una molecola di trasduzione del segnale coinvolta nella sottoregolazione della via di attivazione di CD3/TCR (Iouzalén et al. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:2885-2891). Inoltre, è stato mostrato che le cellule T regolatrici CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) esprimono LAG-3 in seguito alla loro attivazione, e che gli anticorpi diretti contro LAG-3 inibiscono la soppressione esercitata dalle cellule T<sub>reg</sub> indotte sia in vitro che in vivo, suggerendo un contributo di LAG-3 all'attività di soppressione delle cellule T<sub>reg</sub> (Huang, C. et al. (2004) *Immunity* 21:503-513). Inoltre ancora, è stato mostrato che LAG-3 regola negativamente l'omeostasi delle cellule T esercitata dalle cellule T regolatrici sia in un meccanismo dipendente che in uno indipendente dalle cellule T (Workman, C.J. e Vignali, D.A. (2005) *J. Immunol.* 174:688-695).

In certe circostanze, è stato anche mostrato che LAG-3 possiede effetti immunostimolanti. Ad esempio, delle cellule tumorali trasfettate con LAG-3 e trapiantate in topi singenici mostravano una marcata riduzione o una completa regressione della crescita rispetto a cellule tumorali non trasfettate, suggerendo che l'espressione di LAG-3 sulle cellule tumorali stimolasse una risposta anti-tumorale mediante innesco delle cellule di presentazione dell'antigene attraverso le molecole MHC di classe II (Prigent et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:3867-3876). Inoltre, è stato mostrato che la

proteina di fusione LAG-3 solubile-Ig, quando somministrata a topi insieme ad un antigene, stimola sia una risposta immunitaria umorale che una cellulare, indicando un possibile ruolo della LAG-3 solubile-Ig come adiuvante vaccinale (El Mir e Triebel (2000) J. Immunol. 164:5583-5589). Inoltre, è stato mostrato che la LAG-3 solubile-Ig umana amplifica la generazione in vitro di un'immunità tumore-specifica di tipo I (Casati et al. (2006) Cancer Res. 66:4450-4460). L'attività funzionale di LAG-3 è ulteriormente rivisitata in Triebel (2003) Trends Immunol. 24:619-622. Alla luce di quanto riportato sopra, destano interesse ulteriori agenti capaci di modulare l'attività di LAG-3.

#### Riepilogo

La presente divulgazione fornisce anticorpi monoclonali isolati (in particolare anticorpi monoclonali umani), e loro porzioni leganti l'antigene, che legano specificatamente la LAG-3 umana e che comprendono: (a) una sequenza di regione variabile di catena pesante avente un'identità di sequenza di amminoacidi di almeno 95% con SEQ ID NO:37 e una sequenza di regione variabile di catena leggera avente un'identità di sequenza di amminoacidi di almeno 95% con SEQ ID NO:43.

Gli anticorpi dell'invenzione, e le loro porzioni leganti l'antigene, hanno proprietà funzionali desiderabili. Queste proprietà comprendono un'alta affinità per la LAG-3 umana, il legame alle LAG-3 di essere umano e di scimmia (ad esempio la LAG-3 di cynomolgus e/o di scimmia rhesus) ma non alla LAG-3 di topo, la capacità di inibire il legame di LAG-3 alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, e/o la capacità di stimolare risposte a cellule T antigene-specifiche. Gli anticorpi dell'invenzione possono essere usati, ad esempio, per rilevare una proteina LAG-3 o per stimolare risposte a cellule T antigene-specifiche, ad esempio in un soggetto portatore di un tumore o in un soggetto portatore di un virus.

In un aspetto, l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, è un anticorpo monoclonale umano isolato, o una sua porzione legante l'antigene, in cui l'anticorpo lega la LAG-3 umana e mostra almeno una delle seguenti proprietà:

- (a) lega una LAG-3 di scimmia;
- (b) non lega la LAG-3 di topo;
- (c) inibisce il legame di LAG-3 alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II;



e

(d) stimola una risposta immunitaria.

Preferibilmente, l'anticorpo mostra almeno due delle proprietà (a), (b), (c) e (d). Più preferibilmente, l'anticorpo mostra almeno tre delle proprietà (a), (b), (c) e (d). Ancora più preferibilmente, l'anticorpo mostra tutte e quattro le proprietà (a), (b), (c) e (d).

5

In una forma esecutiva preferita, l'anticorpo stimola una risposta a cellule T antigene-specifica, come la produzione di interleuchina-2 (IL-2) in una risposta a cellule T antigene-specifica. In altre forme esecutive, l'anticorpo stimola una risposta immunitaria, come una risposta antitumorale (ad esempio, inibendo la crescita di un tumore in un modello di innesto tumorale in vivo) o una risposta autoimmune (ad esempio, promuovendo lo sviluppo del diabete nei topi NOD). In un'altra forma esecutiva preferita, l'anticorpo lega un epitopo della LAG-3 umana che comprende la sequenza di amminoacidi PGHPLAPG (SEQ ID NO:76). In ancora un'altra forma esecutiva preferita, l'anticorpo lega un epitopo della LAG-3 umana che comprende la sequenza di amminoacidi HPAAPSSW (SEQ ID NO:77) o PAAPSSWG (SEQ ID NO:78). In ancora altre forme esecutive, l'anticorpo si lega alla LAG-3 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-7}$  M o meno, o si lega alla LAG-3 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-8}$  M o meno, o si lega alla LAG-3 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, o si lega alla LAG-3 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-9}$  M o meno. In una forma esecutiva, l'anticorpo colora un tessuto ipofisario in immunohistochimica, mentre, in un'altra forma esecutiva, l'anticorpo non colora un tessuto ipofisario in immunohistochimica.

10

15

In un altro aspetto, l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, è un anticorpo monoclonale umano isolato o una sua porzione legante l'antigene, in cui l'anticorpo cross-compete per il legame alla LAG-3 umana con un anticorpo di riferimento, in cui l'anticorpo di riferimento comprende: una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:37 e una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:43.

20

In un altro aspetto, l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, è un anticorpo monoclonale isolato o una sua porzione legante l'antigene comprendente una regione variabile di catena pesante che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_H$  3-20 umano, un gene  $V_H$  4-34 umano, un gene  $V_H$  3-33 umano o un gene  $V_H$  1-24 umano, in

25



cui l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana. In un altro aspetto, l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, è un anticorpo monoclonale isolato o una sua porzione legante l'antigene comprendente una regione variabile di catena leggera che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_K$  L18 umano, un gene  $V_K$  L6 umano o un gene  $V_K$  A27 umano, in cui l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana. In una forma esecutiva preferita, l'invenzione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente: una regione variabile di catena pesante che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_H$  4-34 umano, e una regione variabile di catena leggera che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_K$  L6 umano; in cui l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana.

In un altro aspetto, l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, è un anticorpo monoclonale isolato o sua porzione legante l'antigene comprendente:

- (a) una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:37; e
- (b) una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:43.

Gli anticorpi dell'invenzione possono essere, ad esempio, anticorpi di lunghezza integrale, ad esempio di un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. In una forma esecutiva preferita, l'anticorpo è un isotipo IgG4. In un'altra forma esecutiva preferita, l'anticorpo è un isotipo IgG4 avente una mutazione da serina a prolina nella regione cerniera della regione costante della catena pesante (in una posizione corrispondente alla posizione 241 come descritto in Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105-108), riducendo o abolendo così l'eterogeneità dei ponti disolfuro inter-catena pesante. In alternativa, gli anticorpi possono essere frammenti di anticorpo, come frammenti Fab, Fab' o Fab'2, o possono essere anticorpi a catena singola.

Questa divulgazione fornisce anche un immunoconiugato comprendente un anticorpo dell'invenzione, o una sua porzione legante l'antigene, collegato/a ad un agente terapeutico, come una citotossina o un isotopo radioattivo. Questa divulgazione fornisce anche una molecola bispecifica comprendente un anticorpo o una sua porzione legante l'antigene dell'invenzione, collegato/a ad una seconda porzione funzionale avente una specificità di legame differente rispetto a quella di detto anticorpo o di detta sua porzione legante l'antigene.



Vengono anche fornite composizioni comprendenti un anticorpo o una sua porzione legante l'antigene, un immunoconiugato o una molecola bispecifica dell'invenzione, e un trasportatore farmaceuticamente accettabile.

5 Questa divulgazione comprende inoltre molecole di acido nucleico codificanti per gli anticorpi dell'invenzione o per le loro porzioni leganti l'antigene, come anche vettori di espressione comprendenti tali acidi nucleici e cellule ospiti comprendenti tali vettori di espressione. Vengono anche forniti metodi per preparare anticorpi anti-LAG-3 attraverso l'uso delle cellule ospiti comprendenti tali vettori di espressione, e tali metodi possono comprendere i passaggi di (i) esprimere l'anticorpo nella cellula ospite, e (ii) isolare l'anticorpo dalla cellula ospite.

10 In un altro aspetto, l'invenzione riguarda anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione, o loro porzioni leganti l'antigene, da usare in metodi per stimolare risposte immunitarie. Ad esempio, viene qui descritto un metodo per stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica, che prevede di mettere in contatto detta cellula T con un anticorpo dell'invenzione in maniera tale da stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica. Preferibilmente, viene stimolata la produzione di interleuchina-2 da parte della cellula T antigene-specifica. Inoltre, viene qui descritto un metodo per stimolare una risposta immunitaria (ad esempio una risposta a cellule T antigene-specifica) in un soggetto, che prevede di somministrare un anticorpo dell'invenzione al soggetto in maniera tale da stimolare una risposta immunitaria (ad  
15 esempio una risposta a cellule T antigene-specifica) nel soggetto. In un metodo preferito, il soggetto è un soggetto portatore di un tumore, e la risposta stimolata è una risposta immunitaria contro il tumore. In un altro metodo preferito, il soggetto è un soggetto portatore di un virus, e la risposta stimolata è una risposta immunitaria contro il virus.

20 In ancora un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione, o sue porzioni leganti l'antigene, da usare in un metodo per inibire la crescita di cellule tumorali in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo dell'invenzione, o le sue porzioni leganti l'antigene, in maniera tale da inibire la crescita del tumore nel soggetto. In ancora un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione, o sue porzioni leganti l'antigene, da usare in un metodo per trattare un'infezione virale in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo dell'invenzione, o le sue porzioni leganti l'antigene, in maniera tale da trattare l'infezione virale nel soggetto.



In ancora un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione, o sue porzioni leganti l'antigene, da usare in un metodo per stimolare una risposta immunitaria in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo anti-LAG-3, o le sue porzioni leganti l'antigene, e almeno un anticorpo immunostimolante addizionale, come un anticorpo anti-PD-1, un anticorpo anti-PD-L1 e/o un anticorpo anti-CTLA-4, in maniera tale da stimolare una risposta immunitaria nel soggetto, ad esempio per inibire la crescita di un tumore o per stimolare una risposta anti-virale. In una forma esecutiva, il soggetto riceve in somministrazione un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-PD-1. In un'altra forma esecutiva, il soggetto riceve in somministrazione un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-PD-L1. In ancora un'altra forma esecutiva, il soggetto riceve in somministrazione un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-CTLA-4. In una forma esecutiva, l'anticorpo anti-LAG-3 è un anticorpo umano, come un anticorpo della divulgazione. In alternativa, l'anticorpo anti-LAG-3 può essere, ad esempio, un anticorpo chimerico o umanizzato. In un'altra forma esecutiva, l'almeno un anticorpo immunostimolante addizionale (ad esempio un anticorpo anti-PD-1, anti-PD-L1 e/o anti-CTLA-4) è un anticorpo umano. In alternativa, l'almeno un anticorpo immunostimolante addizionale può essere, ad esempio, un anticorpo chimerico o umanizzato.

Breve descrizione dei disegni

La Figura 1A mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:49) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:37) della regione variabile di catena pesante dell'anticorpo monoclonale umano 25F7. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:1), CDR2 (SEQ ID NO:7) e CDR3 (SEQ ID NO:13) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V, D e J sono indicate.

La Figura 1B mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:55) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:43) della regione variabile di catena leggera kappa dell'anticorpo monoclonale umano 25F7. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:19), CDR2 (SEQ ID NO:25) e CDR3 (SEQ ID NO:31) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V e J sono indicate.

La Figura 2A mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:50) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:38) della regione variabile di catena pesante dell'anticorpo monoclonale umano 26H10. Le regioni di CDR1 (SEQ



ID NO:2), CDR2 (SEQ ID NO:8) e CDR3 (SEQ ID NO:14) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V, D e J sono indicate.

5 La Figura 2B mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:56) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:44) della regione variabile di catena leggera kappa dell'anticorpo monoclonale umano 26H10. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:20), CDR2 (SEQ ID NO:26) e CDR3 (SEQ ID NO:32) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V e J sono indicate.

10 La Figura 3A mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:51) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:39) della regione variabile di catena pesante dell'anticorpo monoclonale umano 25E3. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:3), CDR2 (SEQ ID NO:9) e CDR3 sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V, D e J sono indicate.

La Figura 3B mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:57) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:45) della regione variabile di catena leggera kappa dell'anticorpo monoclonale umano 25E3. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:27) e CDR3 (SEQ ID NO:33) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V e J sono indicate.

15 La Figura 4A mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:52) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:40) della regione variabile di catena pesante dell'anticorpo monoclonale umano 8B7. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:10) e CDR3 (SEQ ID NO:16) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V, D e J sono indicate.

20 La Figura 4B mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:58) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:46) della regione variabile di catena leggera kappa dell'anticorpo monoclonale umano 8B7. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:22), CDR2 (SEQ ID NO:28) e CDR3 (SEQ ID NO:34) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V e J sono indicate.

La Figura 5A mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:53) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:41) della regione variabile di catena pesante dell'anticorpo monoclonale umano 11F2. Le regioni di CDR1 (SEQ ID



NO:5), CDR2 (SEQ ID NO:11) e CDR3 (SEQ ID NO:17) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V, D e J sono indicate.

5 La Figura 5B mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:59) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:47) della regione variabile di catena leggera kappa dell'anticorpo monoclonale umano 11F2. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:23), CDR2 (SEQ ID NO:29) e CDR3 (SEQ ID NO:35) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V e J sono indicate.

10 La Figura 6A mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:54) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:42) della regione variabile di catena pesante dell'anticorpo monoclonale umano 17E5. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:6), CDR2 (SEQ ID NO:12) e CDR3 (SEQ ID NO:18) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V, D e J sono indicate.

La Figura 6B mostra la sequenza di nucleotidi (SEQ ID NO:60) e la sequenza di amminoacidi (SEQ ID NO:48) della regione variabile di catena leggera kappa dell'anticorpo monoclonale umano 17E5. Le regioni di CDR1 (SEQ ID NO:24), CDR2 (SEQ ID NO:30) e CDR3 (SEQ ID NO:36) sono evidenziate, e le derivazioni dalla linea germinale per V e J sono indicate.

15 La Figura 7 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi delle regioni variabili di catena pesante di 25F7 (SEQ ID NO:37) e le sequenze di amminoacidi di V<sub>H</sub> 4-34 e JH5b della linea germinale umana (SEQ ID NO: 61 e 62, rispettivamente).

20 La Figura 8 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 25F7 (SEQ ID NO:43) e le sequenze di amminoacidi di V<sub>k</sub> L6 e JK2 della linea germinale umana (SEQ ID NO: 63 e 64, rispettivamente).

La Figura 9 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi delle regioni variabili di catena pesante di 26H10 (SEQ ID NO:38) e le sequenze di amminoacidi di V<sub>H</sub> 3-33 e JH6B della linea germinale umana (SEQ ID NO: 65 e 66, rispettivamente).



La Figura 10 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 26H10 (SEQ ID NO:44) e le sequenze di amminoacidi di  $V_k$  A27 e JK3 della linea germinale umana (SEQ ID NO:67 e 68, rispettivamente).

5 La Figura 11 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi delle regioni variabili di catena pesante di 25E3 (SEQ ID NO:39) e le sequenze di amminoacidi di  $V_H$  3-20 e JH4b della linea germinale umana (SEQ ID NO: 69 e 70, rispettivamente).

La Figura 12 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 25E3 (SEQ ID NO:45) e le sequenze di amminoacidi di  $V_k$  L18 e JK2 della linea germinale umana (SEQ ID NO: 71 e 64, rispettivamente).

10 La Figura 13 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi delle regioni variabili di catena pesante di 8B7 (SEQ ID NO:40) e le sequenze di amminoacidi di  $V_H$  4-34 e JH5b della linea germinale umana (SEQ ID NO: 61 e 62, rispettivamente).

15 La Figura 14 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 8B7 (SEQ ID NO:46) e le sequenze di amminoacidi di  $V_k$  L6 e JK4 della linea germinale umana (SEQ ID NO: 63 e 72, rispettivamente).

La Figura 15 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi delle regioni variabili di catena pesante di 11F2 (SEQ ID NO:41) e le sequenze di amminoacidi di  $V_H$  1-24 e JH4b della linea germinale umana (SEQ ID NO: 73 e 70, rispettivamente).

20 La Figura 16 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 11F2 (SEQ ID NO:47) e le sequenze di amminoacidi di  $V_k$  L6 e JK1 della linea germinale umana (SEQ ID NO: 63 e 74, rispettivamente).

La Figura 17 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi delle regioni variabili di catena pesante di 17E5 (SEQ NO: 42) e le sequenze di amminoacidi di  $V_H$  3-33 e 2-2 della linea germinale umana (SEQ ID NO: 65 e 70, rispettivamente).



La Figura 18 mostra l'allineamento tra la sequenza di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 17E5 (SEQ ID NO:48) e le sequenze di amminoacidi di  $V_k$  L6 della linea germinale umana (SEQ ID NO: 63 e 75, rispettivamente).

5 La Figura 19 mostra l'allineamento tra la sequenza proteica codificata dal clone a cDNA di LAG-3 di scimmia pa23-5 (SEQ ID NO:93) e la sequenza della proteina LAG-3 di scimmia rhesus depositata in Genbank (SEQ ID NO:94) (n° d'ingresso Genbank XM\_001108923). La regione del peptide di ansa supplementare e il dominio transmembrana sono sottolineati. La differenza di un amminoacido tra le due sequenze (posizione di amminoacido 419) è evidenziata in grassetto.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

10 La presente divulgazione riguarda anticorpi monoclonali isolati come definiti nella rivendicazione 1, in particolare anticorpi monoclonali umani, che si legano alla LAG-3 umana e che hanno proprietà funzionali desiderabili. Questa divulgazione fornisce anticorpi isolati, metodi per produrre tali anticorpi, immunoconiugati e molecole bispecifiche che comprendono tali anticorpi, e composizioni farmaceutiche che contengono gli anticorpi, gli immunoconiugati o le molecole bispecifiche dell'invenzione. Inoltre, vengono qui descritti metodi di utilizzo degli anticorpi, ad esempio per rilevare una proteina LAG-3, come anche metodi di utilizzo degli anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione, da soli o in combinazione con altri anticorpi immunostimolanti, per stimolare risposte immunitarie. Di conseguenza, questa divulgazione fornisce anche gli anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione da usare, ad esempio, per inibire la crescita di un tumore o per trattare un'infezione virale.

20 Affinché la presente divulgazione possa essere compresa con maggiore facilità, vengono innanzitutto definiti certi termini. Ulteriori definizioni sono riportate nel corso di tutta la descrizione dettagliata.

Il termine "LAG-3" identifica il gene di attivazione dei linfociti-3. Il termine "LAG-3" comprende varianti, isoforme, omologhi, ortologhi e paraloghi. Ad esempio, gli anticorpi specifici per una proteina LAG-3 umana possono, in alcuni casi, cross-reagire con una proteina LAG-3 di una specie diversa da quella umana. In altre forme esecutive, gli anticorpi specifici per una proteina LAG-3 umana possono essere completamente specifici per la proteina LAG-3  
25 umana senza mostrare una cross-reattività di specie o altri tipi di cross-reattività, o possono cross-reagire con le LAG-3



di certe altre specie ma non di tutte le altre specie (ad esempio, possono cross-reagire con una LAG-3 di scimmia ma non con la LAG-3 murina). Il termine "LAG-3 umana" identifica una LAG-3 a sequenza umana, come la sequenza di amminoacidi completa della LAG-3 umana avente il n° d'ingresso Genbank NP\_002277. Il termine "LAG-3 murina" identifica una LAG-3 a sequenza murina, come la sequenza di amminoacidi completa della LAG-3 murina avente il n° d'ingresso Genbank NP\_032505. La LAG-3 è anche nota nel ramo come, ad esempio, CD223. La sequenza della LAG-3 umana può divergere dalla LAG-3 umana con n° d'ingresso Genbank NP\_002277 per il fatto di avere, ad esempio, mutazioni conservate o mutazioni in regioni non conservate che permettono tuttavia di ottenere una LAG-3 avente sostanzialmente la stessa funzione biologica della LAG-3 umana con n° d'ingresso Genbank NP\_002277. Ad esempio, una funzione biologica della LAG-3 umana è il fatto di avere un epitopo nel dominio extracellulare di LAG-3 che viene specificatamente legato da un anticorpo della presente divulgazione, o una funzione biologica della LAG-3 umana è la capacità di legarsi alle molecole MHC di classe II.

Il termine "LAG-3 di scimmia" intende circoscrivere le proteine LAG-3 espresse dalle scimmie del Vecchio Mondo e del Nuovo Mondo tra cui, ma senza limitazioni, la LAG-3 delle scimmie cynomolgus e la LAG-3 delle scimmie rhesus. Una sequenza di amminoacidi rappresentativa di una LAG-3 di scimmia è la sequenza di amminoacidi della LAG-3 di scimmia rhesus mostrata nella Figura 19 e in SEQ ID NO:85, che è anche depositata con il n° d'ingresso Genbank XM\_001108923. Un'altra sequenza di amminoacidi rappresentativa di una LAG-3 di scimmia è la sequenza alternativa di scimmia rhesus del clone pa23-5 mostrata nella Figura 19 e in SEQ ID NO:84, isolata come descritto nell'Esempio 3A, sottosezione 3. Questa sequenza alternativa di rhesus mostra una differenza di un singolo amminoacido, nella posizione 419, rispetto alla sequenza depositata in Genbank.

La sequenza di una LAG-3 umana particolare sarà generalmente almeno 90% identica, in termini di sequenza di amminoacidi, alla LAG-3 umana con n° d'ingresso Genbank NP\_002277, e contiene residui di amminoacido che identificano la sequenza di amminoacidi come umana quando messa a confronto con le sequenze di amminoacidi delle LAG-3 di altre specie (ad esempio di quella murina). In certi casi, una LAG-3 umana può avere un'identità di almeno 95%, o anche di almeno 96%, 97%, 98% o 99% in termini di sequenza di amminoacidi, con la LAG-3 avente il n° d'ingresso Genbank NP\_002277. In certe forme esecutive, la sequenza di una LAG-3 umana mostrerà differenze di non

più di 10 amminoacidi rispetto alla sequenza della LAG-3 con il n° d'ingresso Genbank NP\_002277. In certe forme esecutive, la LAG-3 umana può mostrare una differenza di non più di 5, o anche di non più di 4, 3, 2 o 1 amminoacido, rispetto alla sequenza della LAG-3 con il n° d'ingresso Genbank NP\_002277. La percentuale di identità può essere determinata come qui descritto.

5 Il termine "risposta immunitaria" identifica l'azione, ad esempio di linfociti, di cellule di presentazione dell'antigene, di cellule fagocitarie, di granulociti e di macromolecole solubili prodotte dalle suddette cellule o dal fegato (anticorpi, citochine e complemento inclusi), che provoca il danneggiamento, la distruzione o l'eliminazione selettiva dal corpo umano di patogeni invasori, di cellule o di tessuti infettati da patogeni, di cellule cancerogene o, in caso di autoimmunità o infiammazione patologica, di cellule o tessuti umani normali.

10 Una "risposta a cellule T antigene-specifica" identifica le risposte esercitate da una cellula T che scaturiscono dalla stimolazione della cellula T con l'antigene per cui la cellula T è specifica. Esempi non limitativi delle risposte esercitate da una cellula T in seguito ad una stimolazione antigene-specifica comprendono la proliferazione e la produzione di citochine (ad esempio la produzione di IL-2).

15 Nel presente contesto, il termine "anticorpo" comprende gli anticorpi interi e qualsiasi loro frammento legante l'antigene (ovvero la "porzione legante l'antigene") o catena singola. Gli anticorpi interi sono glicoproteine che comprendono almeno due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) intercollegate per mezzo di legami disolfuro. Ogni catena pesante è costituita da una regione variabile di catena pesante (qui abbreviata come  $V_H$ ) e da una regione costante di catena pesante. La regione costante di catena pesante è costituita da tre domini,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ . Ogni catena leggera è costituita da una regione variabile di catena leggera (qui abbreviata come  $V_L$ ) e da una regione costante di catena leggera. La regione costante della catena leggera è costituita da un unico dominio,  $C_L$ . Le regioni  $V_H$  e  $V_L$  possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, denominate regioni di determinazione della complementarietà (CDR), inframmezzate con regioni più conservate che prendono il nome di regioni strutturali (FR). Ciascuna delle  $V_H$  e delle  $V_L$  è costituita da tre CDR e da quattro FR, disposte nel seguente ordine dall'ammino-terminale al carbossi-terminale: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Le regioni variabili delle catene pesanti e  
25 delle catene leggere contengono un dominio legante che interagisce con un antigene. Le regioni costanti degli anticorpi



possono mediare il legame dell'immunoglobulina con tessuti o fattore dell'ospite, incluso con varie cellule del sistema immunitario (ad esempio con le cellule effettrici) e con il primo componente (C1q) del sistema classico del complemento.

5 Nel presente contesto, il termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo (o semplicemente "porzione di anticorpo") identifica uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi specificatamente ad un antigene (ad esempio ad una proteina LAG-3). È stato mostrato che la funzione di legame all'antigene di un anticorpo può essere espletata da frammenti di un anticorpo di lunghezza integrale. Esempi di frammenti leganti circoscritti nel termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo comprendono (i) un frammento Fab, un frammento monovalente costituito dai domini  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  e  $C_{H1}$ ; (ii) un frammento  $F(ab')_2$ , un frammento bivalente comprendente due frammenti 10 Fab collegati per mezzo di un ponte disolfuro sulla regione cerniera; (iii) un frammento Fab', che è essenzialmente un Fab con parte della regione cerniera (vedere *FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY* (redattore Paul, 3<sup>a</sup> ed. 1993); (iv) un frammento Fd costituito dai domini  $V_H$  e  $C_{H1}$ ; (v) un frammento Fv costituito dai domini  $V_L$  e  $V_H$  di un singolo braccio di un anticorpo, (vi) un frammento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546), che è costituito da un dominio  $V_H$ ; (vii) una regione di determinazione della complementarità (CDR) isolata; e (viii) una nanocorpo, ovvero una regione 15 variabile di catena pesante contenente un singolo dominio variabile e due domini costanti. Inoltre, benché i due domini  $V_L$  e  $V_H$  del frammento Fv vengano codificati da geni separati, essi possono essere uniti, utilizzando metodi ricombinanti, attraverso un raccordo sintetico che permette di produrli come una singola catena proteica in cui le regioni  $V_L$  e  $V_H$  si appaiano per formare molecole monovalenti (note come Fv a catena singola (scFv); vedere ad esempio Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Il termine 20 "porzione legante l'antigene" di un anticorpo intende comprendere anche tali anticorpi a catena singola. Questi frammenti di anticorpo vengono ottenuti usando tecniche convenzionali che sono note agli esperti del ramo, e lo screening dell'utilità dei frammenti viene condotto allo stesso modo di quello degli anticorpi intatti.

25 Nel presente contesto, un "anticorpo isolato" intende identificare un anticorpo sostanzialmente libero da altri anticorpi che mostrano una specificità per antigeni differenti (ad esempio, un anticorpo isolato che lega specificatamente una proteina LAG-3 è sostanzialmente libero da anticorpi che legano specificatamente antigeni diversi



dalle proteine LAG-3). Tuttavia, un anticorpo isolato che lega specificatamente una proteina LAG-3 umana può mostrare una cross-reattività con altri antigeni, ad esempio con proteine LAG-3 di altre specie. Inoltre, un anticorpo isolato può essere sostanzialmente libero da altri materiali cellulari e/o da altre sostanze chimiche.

5 Nel presente contesto, i termini "anticorpo monoclonale" o "composizione di anticorpo monoclonale" identificano una preparazione di molecole di anticorpo aventi un'unica composizione molecolare. Una composizione di anticorpo monoclonale mostra una singola specificità di legame e una singola affinità per un particolare epitopo.

10 Nel presente contesto, il termine "anticorpo umano" intende comprendere anticorpi aventi regioni variabili in cui sia le regioni strutturali che le regioni di CDR derivano da sequenze immunoglobuliniche della linea germinale umana. Inoltre, se l'anticorpo contiene una regione costante, anche la regione costante deriva da sequenze immunoglobuliniche della linea germinale umana. Gli anticorpi umani dell'invenzione possono comprendere residui di amminoacido non codificati da sequenze immunoglobuliniche della linea germinale umana (ad esempio, mutazioni introdotte tramite mutagenesi casuale o sito-specifica in vitro o tramite mutazione somatica in vivo). Nel presente contesto, tuttavia, il termine "anticorpo umano" non intende comprendere anticorpi aventi sequenze strutturali umane su cui sono state innestate sequenze di CDR derivate dalla linea germinale di un'altra specie di mammifero, come ad esempio un topo.

15 Il termine "anticorpo monoclonale umano" identifica anticorpi che mostrano una singola specificità di legame e che hanno regioni variabili in cui sia le regioni strutturali che le regioni di CDR derivano da sequenze immunoglobuliniche della linea germinale umana. In una forma esecutiva, gli anticorpi monoclonali umani vengono prodotti da un ibridoma che comprende una cellula B ottenuta da un animale non umano transgenico, ad esempio da un topo transgenico, avente un genoma comprendente un transgene di catena pesante umana e un transgene di catena leggera umana, fusa ad una cellula immortalizzata.

20 Nel presente contesto, il termine "anticorpo umano ricombinante" comprende tutti gli anticorpi umani che vengono preparati, espressi, creati o isolati tramite mezzi ricombinanti, come (a) anticorpi isolati da un animale (ad esempio un topo) che è transgenico o transcromosomico per geni immunoglobulinici umani, o isolati da un ibridoma preparato dallo stesso (descritto ulteriormente sotto), (b) anticorpi isolati da una cellula ospite trasformata per esprimere



l'anticorpo umano, ad esempio da un trasfettoma, (c) anticorpi isolati da una libreria combinatoriale di anticorpi umani ricombinanti, e (d) anticorpi preparati, espressi, creati o isolati attraverso qualsiasi altro mezzo che prevede lo splicing di sequenze di geni immunoglobulinici umani con altre sequenze di DNA. Tali anticorpi umani ricombinanti hanno regioni variabili in cui le regioni strutturali e le regioni di CDR derivano da sequenze immunoglobuliniche della linea germinale umana. In certe forme esecutive, tuttavia, tali anticorpi ricombinanti umani possono essere sottoposti a mutagenesi in vitro (o, in caso di utilizzo di un animale transgenico per sequenze di Ig umane, a mutagenesi somatica in vivo) e, pertanto, le sequenze di amminoacidi delle regioni  $V_H$  e  $V_L$  degli anticorpi ricombinanti sono sequenze che, pur derivando ed essendo correlate a sequenze  $V_H$  e  $V_L$  della linea germinale umana, possono non esistere in natura all'interno del repertorio in vivo di anticorpi della linea germinale umana.

Il termine "isotipo" identifica la classe di anticorpi (ad esempio IgM o IgG1) che viene codificata dai geni per le regioni costanti di catena pesante.

Le frasi "un anticorpo che riconosce un antigene" e "un anticorpo specifico per un antigene" vengono qui usate in modo intercambiabile con il termine "un anticorpo che si lega specificatamente ad un antigene".

Il termine "derivati di un anticorpo umano" identifica qualsiasi forma modificata dell'anticorpo umano, ad esempio un coniugato dell'anticorpo con un altro agente o anticorpo.

Il termine "anticorpo umanizzato" intende identificare anticorpi aventi sequenze strutturali umane su cui sono state innestate delle sequenze di CDR derivate dalla linea germinale di un'altra specie di mammifero, come ad esempio un topo. All'interno delle sequenze strutturali umane è possibile apportare ulteriori modifiche alle regioni strutturali.

Il termine "anticorpo chimerico" intende identificare anticorpi in cui le sequenze di regione variabile derivano da una specie e le sequenze di regione costante derivano da un'altra specie, come un anticorpo in cui le sequenze di regione variabile derivano da un anticorpo murino e le sequenze di regione costante derivano da un anticorpo umano.

Nel presente contesto, un anticorpo che "lega specificatamente la LAG-3 umana" intende identificare un anticorpo che si lega alla proteina LAG-3 umana (e possibilmente ad una proteina LAG-3 di una o più specie non umane) senza tuttavia legarsi sostanzialmente a proteine diverse da LAG-3. Preferibilmente, l'anticorpo si lega alla proteina LAG-3 umana con una "alta affinità", ovvero con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-7}$  M o meno, più preferibilmente di  $5 \times 10^{-8}$



M o meno, più preferibilmente di  $3 \times 10^{-8}$  M o meno, più preferibilmente di  $1 \times 10^{-8}$  M o meno, più preferibilmente di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, o ancora più preferibilmente di  $1 \times 10^{-9}$  M o meno.

5 Nel presente contesto, il termine "non si lega sostanzialmente" ad una proteina o a cellule significa che non si lega, o che non si lega con un'alta affinità, alla proteina o alle cellule, ovvero che si lega alla proteina o alle cellule con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-6}$  M o più, più preferibilmente di  $1 \times 10^{-5}$  M o più, più preferibilmente di  $1 \times 10^{-4}$  M o più, più preferibilmente di  $1 \times 10^{-3}$  M o più, ancora più preferibilmente di  $1 \times 10^{-2}$  M o più.

10 Nel presente contesto, il termine " $K_{\text{assoc}}$ " o " $K_a$ " intende identificare la velocità di associazione di una particolare interazione anticorpo-antigene, mentre il termine " $K_{\text{dis}}$ " o " $K_d$ ", sempre nel presente contesto, intende identificare la velocità di dissociazione di una particolare interazione anticorpo-antigene. Nel presente contesto, il termine " $K_D$ " intende identificare la costante di dissociazione, che viene ottenuta dal rapporto tra  $K_d$  e  $K_a$  (ovvero  $K_d/K_a$ ) e che viene espressa in termini di concentrazione molare (M). I valori di  $K_D$  per gli anticorpi possono essere determinati attraverso metodi ben consolidati nel ramo. Un metodo preferito per determinare la  $K_D$  di un anticorpo è l'uso della risonanza plasmonica di superficie, preferibilmente adoperando un sistema biosensore come un sistema Biacore®.

15 Il termine "alta affinità" per un anticorpo a IgG identifica un anticorpo avente una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-7}$  M o meno, più preferibilmente di  $5 \times 10^{-8}$  M o meno, ancora più preferibilmente di  $1 \times 10^{-8}$  M o meno, ancora più preferibilmente di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, e ancora più preferibilmente di  $1 \times 10^{-9}$  M o meno per un antigene bersaglio. Tuttavia, il legame ad "alta affinità" può variare per altri isotipi di un anticorpo. Ad esempio, un legame ad "alta affinità" per un isotipo IgM  
20 identifica un anticorpo avente una  $K_D$  di  $10^{-6}$  M o meno, più preferibilmente di  $10^{-7}$  M o meno, ancora più preferibilmente di  $10^{-8}$  M o meno.

Il termine "soggetto" comprende qualsiasi animale umano o non umano. Il termine "animale non umano" comprende tutti i vertebrati, ad esempio mammiferi e non mammiferi, come primati non umani, pecore, cani, gatti, vacche, cavalli, polli, anfibi e rettili, quantunque i mammiferi, come primati non umani, pecore, cani, gatti, vacche e cavalli, siano preferiti.

25 Vari aspetti dell'invenzione vengono descritti in ulteriore dettaglio nelle seguenti sottosezioni.



#### Anticorpi anti-LAG-3 in possesso di proprietà funzionali particolari

Gli anticorpi dell'invenzione sono caratterizzati da particolari peculiarità o proprietà funzionali a livello di anticorpi. Ad esempio, gli anticorpi si legano specificatamente alla LAG-3 umana e possono legarsi alle LAG-3 di certe altre specie, come ad esempio ad una LAG-3 di scimmia (ad esempio di scimmia cynomolgus, di scimmia rhesus), senza tuttavia legarsi sostanzialmente alle LAG-3 di certe altre specie, ad esempio alla LAG-3 murina. Preferibilmente, un anticorpo dell'invenzione si lega alla LAG-3 umana con un'alta affinità.

La capacità dell'anticorpo di stimolare una risposta immunitaria, come una risposta a cellule T antigene-specifica, può essere ad esempio indicata dalla capacità dell'anticorpo di stimolare la produzione di interleuchina-2 (IL-2) in una risposta a cellule T antigene-specifica. In certe forme esecutive, un anticorpo dell'invenzione si lega alla LAG-3 umana e mostra la capacità di stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica. In altre forme esecutive, un anticorpo dell'invenzione si lega alla LAG-3 umana ma non mostra una capacità di stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica. Altri mezzi con cui valutare la capacità dell'anticorpo di stimolare una risposta immunitaria comprendono la capacità dell'anticorpo di inibire la crescita di un tumore, come in un modello di innesto tumorale in vivo (vedere ad esempio l'Esempio 6), o la capacità dell'anticorpo di stimolare una risposta autoimmune, come la capacità di promuovere lo sviluppo di una malattia autoimmune in un modello autoimmune, ad esempio la capacità di promuovere lo sviluppo del diabete nel modello di topo NOD (vedere ad esempio l'Esempio 7).

Il legame di un anticorpo dell'invenzione a LAG-3 può essere valutato utilizzando una o più tecniche ben consolidate nel ramo. Ad esempio, in una forma esecutiva preferita, un anticorpo può essere esaminato attraverso un saggio in citometria di flusso in cui l'anticorpo viene fatto reagire con una linea cellulare che esprime la LAG-3 umana, come cellule CHO trasfettate per esprimere una LAG-3 (ad esempio la LAG-3 umana, una LAG-3 di scimmia (ad esempio di scimmia rhesus o cynomolgus) o la LAG-3 murina) sulla loro superficie cellulare (vedere ad esempio l'Esempio 3A per un saggio adatto). Altre cellule adatte per l'uso nei saggi in citometria di flusso sono le cellule T CD4<sup>+</sup> attivate stimulate con anti-CD3, che esprimono la LAG-3 nativa. In aggiunta o in alternativa, il legame dell'anticorpo, inclusa la cinetica di legame (ad esempio il valore di  $K_D$ ), può essere esaminato in saggi di legame su BIAcore (vedere



ad esempio l'Esempio 3B per saggi adatti). Ancora altri saggi di legame adatti comprendono i saggi ELISA, ad esempio utilizzando una proteina LAG-3 ricombinante (vedere ad esempio l'Esempio 1 per un saggio adatto).

5 Preferibilmente, un anticorpo dell'invenzione si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $2 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $4 \times 10^{-9}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $3 \times 10^{-9}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $2 \times 10^{-9}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-9}$  M o meno, si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-10}$  M o meno, o si lega ad una proteina LAG-3 con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-10}$  M o meno.

10 Tipicamente, un anticorpo dell'invenzione si lega a LAG-3 in tessuti linfoidi come tonsilla, milza o timo, dove può essere rilevata attraverso l'immunoistochimica. Inoltre, come ulteriormente descritto nell'Esempio 8, certi anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione colorano un tessuto ipofisario (ad esempio, vengono trattenuti nell'ipofisi), come misurato in immunoistochimica, mentre altri anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione non colorano un tessuto ipofisario (ad esempio, non vengono trattenuti nell'ipofisi), come misurato in immunoistochimica. Così, in una forma esecutiva, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 umano che colora un tessuto ipofisario in immunoistochimica, mentre, in  
15 un'altra forma esecutiva, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 umano che non colora un tessuto ipofisario in immunoistochimica.

Gli anticorpi preferiti dell'invenzione sono anticorpi monoclonali umani. In aggiunta o in alternativa, gli anticorpi possono essere, ad esempio, anticorpi monoclonali chimerici o umanizzati.

Anticorpi monoclonali 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5

20 Un anticorpo preferito dell'invenzione è l'anticorpo monoclonale umano 25F7. 25F7, e gli ulteriori anticorpi anti-LAG-3 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5, sono stati isolati e strutturalmente caratterizzati come descritto negli Esempi 1 e 2. Le sequenze di amminoacidi delle  $V_H$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:37-42. Le sequenze di amminoacidi delle  $V_K$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:43-48.



Poiché ciascuno di questi anticorpi può legarsi alla LAG-3 umana, le sequenze di  $V_H$  e  $V_L$  possono essere "miscelate e abbinate" per creare altre molecole leganti anti-LAG-3. Preferibilmente, quando le catene  $V_H$  e  $V_L$  vengono miscelate e abbinate, una sequenza di  $V_H$  di una particolare coppia  $V_H/V_L$  viene sostituita con una sequenza di  $V_H$  strutturalmente simile. In maniera simile, preferibilmente, una sequenza di  $V_L$  di una particolare coppia  $V_H/V_L$  viene

5 sostituita con una sequenza di  $V_L$  strutturalmente simile.

In un aspetto, questa divulgazione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile di catena pesante che comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:37 e una regione variabile di catena leggera che comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:43.

In un altro aspetto, questa divulgazione fornisce anticorpi che comprendono le CDR1, le CDR2 e le CDR3 della catena pesante e della catena leggera di 25F7. Le sequenze di amminoacidi delle CDR1 delle  $V_H$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:37-42. Le sequenze di amminoacidi delle CDR2 delle  $V_H$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:43-48. Le sequenze di amminoacidi delle CDR3 delle  $V_H$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:13-14, GGY e 16-18. Le sequenze di amminoacidi delle CDR1 delle  $V_K$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:19-24. Le sequenze di amminoacidi delle CDR2 delle  $V_K$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono mostrate in SEQ ID NO:25-30. Le sequenze di amminoacidi delle CDR3 delle  $V_K$  di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:31-36. Le regioni di CDR sono evidenziate utilizzando il sistema di Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edizione, U.S. Department of Health and Human Services, pubblicazione NIH n° 91-3242).

10  
15

Poiché ciascuno di questi anticorpi può legarsi alla LAG-3 umana, e poiché la specificità di legame all'antigene viene principalmente conferita dalle regioni di CDR1, CDR2 e CDR3, le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di  $V_H$  e le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di  $V_L$  possono essere "miscelate e abbinate" (nel senso che le CDR dei differenti anticorpi possono essere miscelate e abbinate benché ogni anticorpo debba contenere una CDR1, una CDR2 e una CDR3 di  $V_H$  e una CDR1, una CDR2 e una CDR3 di  $V_L$ ) allo scopo di creare altre molecole leganti anti-LAG-3. Il legame di tali anticorpi "miscelati e abbinati" a LAG-3 può essere esaminato utilizzando i saggi di legame descritti

20  
25



sopra e negli Esempi (ad esempio ELISA, analisi in Biacore®). Preferibilmente, quando le sequenze miscelate e abbinate sono sequenze CDR di V<sub>H</sub>, la sequenza di CDR1, CDR2 e/o CDR3 di una particolare sequenza di V<sub>H</sub> viene sostituita con una o più sequenze di CDR che sono strutturalmente simili. Analogamente, quando le sequenze miscelate e abbinate sono sequenze CDR di V<sub>L</sub>, la sequenza di CDR1, CDR2 e/o CDR3 di una particolare sequenza di V<sub>L</sub> viene preferibilmente sostituita con una o più sequenze di CDR che sono strutturalmente simili. Per il tecnico di competenza ordinaria risulterà facilmente evidente che, sostituendo le sequenze di una o più regioni di CDR di V<sub>H</sub> e/o V<sub>L</sub> con sequenze strutturalmente simili prese dalle sequenze di CDR qui divulgate per gli anticorpi monoclonali 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5, è possibile creare nuove sequenze di V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>. In una forma esecutiva preferita, l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, comprende:

- 5
- 10
- 15
- (a) una CDR1 di regione variabile di catena pesante comprendente SEQ ID NO:1;
  - (b) una CDR2 di regione variabile di catena pesante comprendente SEQ ID NO:7;
  - (c) una CDR3 di regione variabile di catena pesante comprendente SEQ ID NO:13;
  - (d) una CDR1 di regione variabile di catena leggera comprendente SEQ ID NO:19;
  - (e) una CDR2 di regione variabile di catena leggera comprendente SEQ ID NO:25; e
  - (f) una CDR3 di regione variabile di catena leggera comprendente SEQ ID NO:31.

Nel ramo è noto che il dominio CDR3, indipendentemente dal/dai domini CDR1 e/o CDR2, è in grado di determinare da solo la specificità di legame di un anticorpo per un antigene affine, e che, basandosi su una sequenza di CDR3 comune, è possibile generare molteplici anticorpi aventi la stessa specificità di legame in maniera prevedibile. Vedere ad esempio Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); Rader et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994); Barbas et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995); Ditzel et al., *J. Immunol.* 157:739-749 (1996); Berezov et al., *BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 117:452-7 (1995); Bourgeois et al., *J. Virol.* 72:807-10 (1998); Levi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993); Polymenis e Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994), e Xu e Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). Vedere anche i brevetti US



6.951.646; US 6.914.128; US 6.090.382; US 6.818.216; US 6.156.313; US 6.827.925; US 5.833.943; US 5.762.905 e US 5.760.185.

Anticorpi aventi particolari sequenze della linea germinale

5 In certe forme esecutive, un anticorpo secondo l'invenzione comprende una regione variabile di catena pesante di un particolare gene immunoglobulinico di catena pesante della linea germinale e/o una regione variabile di catena leggera di un particolare gene immunoglobulinico di catena leggera della linea germinale.

10 Ad esempio, in una forma esecutiva preferita, questa divulgazione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile di catena pesante che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_H$  3-20 umano, un gene  $V_H$  4-34 umano, un gene  $V_H$  3-33 umano o un gene  $V_H$  1-24 umano, in cui l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana. In un'altra forma esecutiva preferita, questa divulgazione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile di catena leggera che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_K$  L18 umano, un gene  $V_K$  L6 umano o un gene  $V_K$  A27 umano, in cui l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana. In una forma esecutiva preferita, questa divulgazione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, in cui l'anticorpo comprende una regione  
15 variabile di catena pesante che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_H$  4-34 umano, e comprende una regione variabile di catena leggera che è il prodotto di, o che deriva da, un gene  $V_K$  L6 umano, in cui l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana.

20 Tali anticorpi possono anche possedere una o più delle caratteristiche funzionali descritte sopra in dettaglio, come un'alta affinità di legame per la LAG-3 umana, la capacità di legare una LAG-3 di scimmia, l'incapacità di legare la LAG-3 murina, la capacità di inibire il legame di LAG-3 alle molecole MHC di classe II, e/o la capacità di stimolare risposte a cellule T antigene-specifiche.

Un esempio di un anticorpo avente la  $V_H$  e la  $V_L$  rispettivamente di  $V_H$  3-20 e  $V_K$  H18 è l'anticorpo 25E3. Esempi di anticorpi aventi la  $V_H$  e la  $V_L$  rispettivamente di  $V_H$  4-34 e  $V_K$  L6 sono gli anticorpi 25F7 e 8B7. Un esempio di un anticorpo avente la  $V_H$  e la  $V_L$  rispettivamente di  $V_H$  3-33 e  $V_K$  A27 è l'anticorpo 26H10. Un esempio di un



anticorpo avente la  $V_H$  e la  $V_L$  rispettivamente di  $V_H$  T-24 e  $V_K$  L6 è l'anticorpo 11F2. Un esempio di un anticorpo avente la  $V_H$  e la  $V_L$  rispettivamente di  $V_H$  3-33 e  $V_K$  L6 è l'anticorpo 17E5.

5 Nel presente contesto, un anticorpo umano comprende regioni variabili di catena pesante o leggera che sono "il prodotto di" o che "derivano da" una particolare sequenza della linea germinale se le regioni variabili dell'anticorpo vengono ottenute da un sistema che utilizza geni immunoglobulinici della linea germinale umana. Tali sistemi prevedono di immunizzare un topo transgenico portatore di geni immunoglobulinici umani con l'antigene d'interesse, o prevedono di utilizzare l'antigene d'interesse per sottoporre a screening una libreria di geni immunoglobulinici umani esposti su fago. Un anticorpo umano che è "il prodotto della" o che "deriva dalla" sequenza di un'immunoglobulina della linea germinale umana può essere identificato come tale confrontando la sequenza di amminoacidi dell'anticorpo umano con le sequenze di amminoacidi di immunoglobuline della linea germinale umana, e selezionando la sequenza dell'immunoglobulina della linea germinale umana che più si avvicina alla sequenza dell'anticorpo umano in termini di sequenza (ad esempio, quella che mostra la più alta % di identità). Un anticorpo umano che è "il prodotto della" o che "deriva dalla" sequenza di una particolare immunoglobulina della linea germinale umana può contenere differenze di amminoacido rispetto alla sequenza della linea germinale, ad esempio dovute a mutazioni somatiche esistenti in natura o all'introduzione intenzionale di mutazioni sito-dirette. Tuttavia, un anticorpo umano selezionato mostra tipicamente un'identità di almeno 90%, in termini di sequenza di amminoacidi, con una sequenza di amminoacidi codificata da un gene immunoglobulinico della linea germinale umana, e contiene residui di amminoacido che identificano l'anticorpo umano come umano rispetto alle sequenze di amminoacidi di immunoglobuline delle linee germinali di altre specie (ad esempio, rispetto a sequenze della linea germinale del topo). In certi casi, un anticorpo umano può avere un'identità di almeno 95%, o anche di almeno 96%, 97%, 98% o 99%, in termini di sequenza di amminoacidi, con la sequenza di amminoacidi codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale. Tipicamente, un anticorpo umano derivato da una particolare sequenza della linea germinale umana mostrerà differenze di non più di 10 amminoacidi rispetto alla sequenza di amminoacidi codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale umana. In certi casi, l'anticorpo umano può mostrare differenze di non più di 5, o anche di non più di 4, 3, 2 o 1 amminoacido, rispetto alla sequenza di amminoacidi codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale.

10

15

20

25



#### Anticorpi omologhi

Gli anticorpi dell'invenzione comprendono regioni variabili di catena pesante e leggera comprendenti sequenze di amminoacidi che sono omologhe alle sequenze di amminoacidi dell'anticorpo monoclonale 25F7 qui descritto, e in cui gli anticorpi mantengono le proprietà funzionali desiderate degli anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione. Nello  
5 specifico, questa divulgazione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, che comprende una regione variabile di catena pesante e una regione variabile di catena leggera, in cui:

(a) la regione variabile di catena pesante comprende una sequenza di amminoacidi che ha un'omologia di almeno 95% con una sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:37;

10 (b) la regione variabile di catena leggera comprende una sequenza di amminoacidi che ha un'omologia di almeno 95% con una sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:43; e

(c) l'anticorpo si lega specificatamente alla LAG-3 umana.

15 L'anticorpo può possedere una o più delle seguenti proprietà funzionali discusse sopra, come un'alta affinità di legame per la LAG-3 umana, la capacità di legare una LAG-3 di scimmia, l'incapacità di legare la LAG-3 murina, la capacità di inibire il legame di LAG-3 alle molecole MHC di classe II, e/o la capacità di stimolare risposte a cellule T antigene-specifiche.

In varie forme esecutive, l'anticorpo può essere, ad esempio, un anticorpo umano, un anticorpo umanizzato o un anticorpo chimerico.

20 In altre forme esecutive, le sequenze di amminoacidi della  $V_H$  e/o della  $V_L$  possono avere un'omologia di 96%, 97%, 98% o 99% con le sequenze riportate sopra. Un anticorpo avente regioni  $V_H$  e  $V_L$  che mostrano un'alta omologia (ovvero di 95% o più) con le regioni  $V_H$  e  $V_L$  delle sequenze riportate sopra può essere ottenuto mediante mutagenesi (ad esempio, mediante mutagenesi sito-diretta o PCR-mediata) di molecole di acido nucleico codificanti per SEQ ID NO:49 o 55 e, utilizzando i saggi funzionali qui descritti, può essere esaminato per valutare se l'anticorpo alterato codificato mantiene una certa funzione (ovvero le funzioni riportate sopra).

25 Nel presente contesto, la percentuale di omologia tra due sequenze di amminoacidi è equivalente alla percentuale di identità tra le due sequenze. La percentuale di identità tra le due sequenze è una funzione del numero di



5 posizioni identiche condivise dalle sequenze (ovvero, % di omologia =  $n^\circ$  di posizioni identiche/ $n^\circ$  totale di posizioni x 100), tenendo conto del numero di lacune e della lunghezza di ogni lacuna che deve essere introdotta per ottenere un allineamento ottimale tra le due sequenze. I confronti tra le sequenze e la determinazione della percentuale di identità tra due sequenze possono essere condotti adoperando un algoritmo matematico, come descritto negli esempi non limitativi sottostanti.

10 La percentuale di identità tra due sequenze di amminoacidi può essere determinata impiegando l'algoritmo di E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0), e utilizzando la tabella di pesi dei residui PAM120, un penalità per la lunghezza della lacuna di 12, e una penalità per l'introduzione di una lacuna di 4. Inoltre, la percentuale di identità tra due sequenze di amminoacidi può essere determinata usando l'algoritmo di Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) che è stato incorporato nel programma GAP del pacchetto software GCG (disponibile a <http://www.gcg.com>), e utilizzando una matrice Blossum 62 o una matrice PAM250, un peso per le lacune di 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4, e un peso per le lunghezze di 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

15 In aggiunta o in alternativa, le sequenze proteiche della presente divulgazione possono essere ulteriormente usate come "sequenze di interrogazione" per eseguire una ricerca in banche dati pubbliche, ad esempio allo scopo di identificare sequenze correlate. Tali ricerche possono essere condotte utilizzando il programma XBLAST (versione 2.0) di Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Le ricerche sulle proteine di BLAST possono essere condotte con il programma XBLAST, punteggio=50, lunghezza parola=3, allo scopo di ottenere sequenze di amminoacidi che sono omologhe alle molecole di anticorpo dell'invenzione. Per ottenere allineamenti con lacune per scopi di confronto, è possibile adoperare Gapped BLAST come descritto in Altschul et al. (1991) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Usando i programmi BLAST e Gapped BLAST, sono utili i parametri predefiniti dei rispettivi programmi (ad esempio, XBLAST ed NBLAST). Vedere [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

20 Anticorpi con modifiche conservative

25 In certe forme esecutive, un anticorpo dell'invenzione comprende una regione variabile di catena pesante comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 e una regione variabile di catena leggera comprendente sequenze di



CDR1, CDR2 e CDR3 che hanno sequenze di amminoacidi specificate che sono basate su 25F7, o loro modifiche conservative, e in cui gli anticorpi mantengono le proprietà funzionali desiderate degli anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione. Resta inteso nel ramo che, in una sequenza, è possibile apportare certe modifiche conservative che non abrogano il legame all'antigene. Vedere ad esempio Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:26864-26870; Hall et al. (1992) J. Immunol. 149:1605-12; Kelley e O'Connell (1993) Biochem. 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) Int. Immunol. 10:341-6, e Beers et al. (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43. Pertanto, questa divulgazione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, che comprende una regione variabile di catena pesante comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 e una regione variabile di catena leggera comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3, in cui:

(a) la sequenza di CDR3 della regione variabile di catena pesante comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:13 e sue modifiche conservative;

(b) la sequenza di CDR3 della regione variabile di catena leggera comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:31 e sue modifiche conservative; e

(c) l'anticorpo lega specificatamente la LAG-3 umana.

In aggiunta o in alternativa, l'anticorpo può possedere una o più delle seguenti proprietà funzionali descritte sopra, come un'alta affinità di legame per la LAG-3 umana, la capacità di legare una LAG-3 di scimmia, l'incapacità di legare la LAG-3 murina, la capacità di inibire il legame di LAG-3 alle molecole MHC di classe II, e/o la capacità di stimolare risposte a cellule T antigene-specifiche.

In una forma esecutiva preferita, la sequenza di CDR2 della regione variabile di catena pesante comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:7 e sue modifiche conservative; e la sequenza di CDR2 della regione variabile di catena leggera comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:25 e sue modifiche conservative. In un'altra forma esecutiva preferita, la sequenza di CDR1 della regione variabile di catena pesante comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:1 e sue modifiche conservative; e la sequenza di CDR1 della regione variabile di catena leggera comprende la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:19 e sue modifiche conservative.



In varie forme esecutive, l'anticorpo può essere, ad esempio, un anticorpo umano, un anticorpo umanizzato o un anticorpo chimerico.

Nel presente contesto, il termine "modifiche conservative di sequenza" intende identificare modifiche a livello di amminoacidi che non influenzano o alterano significativamente le caratteristiche di legame o di stabilità dell'anticorpo che contiene la sequenza di amminoacidi. Tali modifiche conservative comprendono sostituzioni, addizioni e delezioni di amminoacidi. Le modifiche possono essere introdotte in un anticorpo dell'invenzione attraverso tecniche standard note nel ramo, ad esempio tramite mutagenesi sito-diretta e mediante mutagenesi PCR-mediata. Le sostituzioni conservative di amminoacido sono quelle in cui il residuo di amminoacido viene sostituito con un residuo di amminoacido avente una catena laterale simile. Le famiglie di residui di amminoacido aventi catene laterali simili sono state definite nel ramo. Queste famiglie comprendono amminoacidi con catene laterali basiche (ad esempio lisina, arginina, istidina), con catene laterali acide (ad esempio acido aspartico, acido glutammico), con catene laterali polari senza carica (ad esempio glicina, asparagina, glutammina, serina, treonina, tirosina, cisteina, triptofano), con catene laterali non polari (ad esempio alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), con catene laterali a ramificazione beta (ad esempio treonina, valina, isoleucina), e con catene laterali aromatiche (ad esempio tirosina, fenilalanina, triptofano, istidina). Pertanto, uno o più residui di amminoacido all'interno delle regioni di CDR di un anticorpo dell'invenzione possono essere sostituiti con altri residui di amminoacido della stessa famiglia di catene laterali e, utilizzando i saggi funzionali qui descritti, l'anticorpo alterato può essere esaminato per valutare se esso è in grado di mantenere una certa funzione (ad esempio le funzioni riportate sopra).

Anticorpi che si legano allo stesso epitopo degli anticorpi anti-LAG-3

Gli anticorpi dell'invenzione si legano allo stesso epitopo dell'anticorpo monoclonale anti-LAG-3 25F7 su LAG-3 (nel senso che hanno la capacità di cross-competere per il legame alla LAG-3 umana con l'anticorpo monoclonale 25F7). In forme esecutive preferite, l'anticorpo di riferimento per gli studi di cross-competizione può essere l'anticorpo monoclonale 25F7.

Tali anticorpi capaci di cross-competizione possono essere identificati in base alla loro capacità di cross-competere con 25F7 in saggi standard di legame a LAG-3. Ad esempio, è possibile utilizzare saggi ELISA standard che



5 prevedono di immobilizzare una proteina LAG-3 umana ricombinante sulla piastra, di marcare in fluorescenza uno degli anticorpi, e di valutare la capacità degli anticorpi non marcati di competere per il legame con l'anticorpo marcato. In aggiunta o in alternativa, per valutare la capacità di cross-competizione degli anticorpi, è possibile utilizzare un'analisi in BIAcore. La capacità di un anticorpo di test di inibire, ad esempio, il legame di 25F7 alla LAG-3 umana, dimostra che l'anticorpo di test ha la capacità di competere con 25F7 per il legame alla LAG-3 umana, legandosi dunque allo stesso epitopo a cui si lega 25F7 sulla LAG-3 umana. In una forma esecutiva preferita, l'anticorpo che si lega allo stesso epitopo di 25F7 sulla LAG-3 umana è un anticorpo monoclonale umano. Tali anticorpi monoclonali umani possono essere preparati e isolati come descritto negli Esempi.

10 Come discusso ulteriormente nell'Esempio 3C, il legame di 25E3, 25F7 e 8B7 alla LAG-3 umana è stato mappato su una regione di "ansa supplementare" all'interno del primo dominio extracellulare della LAG-3 umana. La sequenza della regione di ansa supplementare è riportata in SEQ ID NO:79. Utilizzando un esperimento di scansione peptidica, il legame di 25E3 alla regione di ansa supplementare è stato mappato sulla seguente sequenza di amminoacidi: PGHPLAPG (SEQ ID NO:76), mentre il legame di 25F7 alla regione di ansa supplementare è stato mappato sulla seguente sequenza di amminoacidi: HPAAPSSW (SEQ ID NO:77) e il legame di 8B7 alla regione di

15 ansa supplementare è stato mappato sulla seguente sequenza di amminoacidi: PAAPSSWG (SEQ ID NO:78). Di conseguenza, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 che lega un epitopo della LAG-3 umana comprendente la sequenza di amminoacidi PGHPLAPG (SEQ ID NO:76). Nello specifico, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 che lega un epitopo della LAG-3 umana comprendente la sequenza di amminoacidi HPAAPSSW (SEQ ID NO:77).

#### Anticorpi ingegnerizzati e modificati

20 Un anticorpo avente una o più delle sequenze di  $V_H$  e/o  $V_L$  qui divulgate può essere adoperato come materiale di partenza per ingegnerizzare un anticorpo modificato, il quale anticorpo modificato può avere proprietà alterate rispetto a quelle dell'anticorpo di partenza. L'ingegnerizzazione di un anticorpo può essere condotta modificando uno o più residui che si trovano all'interno di una o di entrambe le regioni variabili (ovvero  $V_H$  e/o  $V_L$ ), ad esempio all'interno di una o più regioni di CDR e/o all'interno di una o più regioni strutturali. In aggiunta o in alternativa,



l'ingegnerizzazione di un anticorpo può essere condotta modificando residui che si trovano all'interno della/delle regioni costanti, ad esempio allo scopo di alterare la/le funzioni effettrici dell'anticorpo.

Ad esempio, per ingegnerizzare le regioni variabili degli anticorpi, è possibile adoperare l'innesto di CDR. Gli anticorpi interagiscono con gli antigeni bersaglio prevalentemente attraverso residui di amminoacido che si trovano  
5 posizionati nelle sei regioni di determinazione della complementarietà (CDR) della catena pesante e della catena leggera. Per questo motivo, passando da un anticorpo all'altro, le sequenze di amminoacidi all'interno delle CDR mostrano una maggiore diversificazione rispetto alle sequenze all'esterno delle CDR. Poiché le sequenze di CDR sono responsabili della maggior parte delle interazioni anticorpo-antigene, l'espressione di anticorpi ricombinanti che mimano le proprietà di specifici anticorpi esistenti in natura può essere ottenuta costruendo vettori di espressione che  
10 comprendono sequenze di CDR dello specifico anticorpo esistente in natura, innestate su sequenze strutturali di un anticorpo differente con proprietà differenti (vedere ad esempio Riechmann et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen et al, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; brevetti US 5.225.539; US 5.530.101; US 5.585.089; US 5.693.762 e US 6.180.370).

Di conseguenza, un'altra forma esecutiva dell'invenzione riguarda un anticorpo monoclonale isolato, o una sua  
15 porzione legante l'antigene, che comprende una regione variabile di catena pesante comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 rispettivamente comprendenti la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:13, e una regione variabile di catena leggera comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 rispettivamente comprendenti la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:31. Pertanto, tali anticorpi contengono le sequenze di CDR di  $V_H$  e  $V_L$  dell'anticorpo monoclonale 25F7, e possono contenere differenti sequenze  
20 strutturali di questo anticorpo.

Tali sequenze strutturali possono essere ottenute da banche dati pubbliche di DNA o da riferimenti pubblicati che comprendono sequenze di geni per anticorpi della linea germinale. Ad esempio, le sequenze di DNA della linea germinale per i geni umani di regione variabile di catena pesante e leggera possono essere trovate nella banca dati di sequenze della linea germinale umana "VBase" (disponibile su Internet a [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)) come anche  
25 in Kabat et al. (1991), citato sopra; Tomlinson et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences



Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836. Come altro esempio, le sequenze di DNA della linea germinale per i geni umani di regione variabile di catena pesante e leggera possono essere trovate nella banca dati Genbank. Ad esempio, le seguenti sequenze di catena pesante della linea germinale del topo HCo7 HuMAb sono disponibili ai n° d'ingresso Genbank accompagnatori: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 & BC070333), 3-33 (NG\_0010109 & NT\_024637) e 3-7 (NG\_0010109 & NT\_024637). Come altro esempio, le seguenti sequenze di catena pesante della linea germinale del topo HCo12 HuMAb sono disponibili ai n° d'ingresso Genbank accompagnatori: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 & BC070333), 5-51 (NG\_0010109 & NT\_024637), 4-34 (NG\_0010109 & NT\_024637), 3-30.3 (CAJ556644) & 3-23 (AJ406678).

Le sequenze proteiche degli anticorpi vengono confrontate con una banca dati compilata di sequenze proteiche utilizzando uno dei metodi di ricerca delle somiglianze di sequenza, denominato Gapped BLAST (Altschul et al. (1997), sopra), che è ben noto agli esperti del ramo.

Le sequenze strutturali preferite per l'uso negli anticorpi dell'invenzione sono quelle che sono strutturalmente simili alle sequenze strutturali adoperate dagli anticorpi selezionati dell'invenzione, ovvero simili alle sequenze strutturali di V<sub>H</sub> 4-34 (SEQ ID NO:61) e/o alle sequenze strutturali di V<sub>K</sub> L6 (SEQ ID NO:63) adoperate dall'anticorpo monoclonale preferito dell'invenzione. Le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di V<sub>H</sub>, e le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di V<sub>K</sub>, possono essere innestate su regioni strutturali che hanno una sequenza identica a quella trovata nel gene immunoglobulinico della linea germinale da cui la sequenza strutturale deriva, o le sequenze di CDR possono essere innestate su regioni strutturali che contengono una o più mutazioni rispetto alle sequenze della linea germinale. Ad esempio, è stato scoperto che, in certi casi, per preservare o migliorare la capacità di legame dell'anticorpo all'antigene, è vantaggioso mutare dei residui all'interno delle regioni strutturali (vedere ad esempio i brevetti US 5.530.101; US 5.585.089; US 5.693.762 e US 6.180.370).

Un altro tipo di modifica a livello di regione variabile prevede di mutare residui di amminoacido all'interno delle regioni di CDR1, CDR2 e/o CDR3 della V<sub>H</sub> e/o della V<sub>L</sub> allo scopo di migliorare una o più proprietà di legame (ad esempio l'affinità) dell'anticorpo d'interesse. Per introdurre la/le mutazioni, è possibile eseguire una mutagenesi sito-



5 diretta o una mutagenesi PCR-mediata, e il loro effetto sul legame o su un'altra proprietà funzionale d'interesse dell'anticorpo può essere valutato, in vitro o in vivo, come qui descritto e fornito negli Esempi. Preferibilmente, le modifiche introdotte sono modifiche conservative (come discusso sopra). Le mutazioni possono essere sostituzioni, aggiunte o delezioni di amminoacido, ma sono preferibilmente sostituzioni. Inoltre, tipicamente, il numero di residui che vengono alterati all'interno di una regione di CDR è non maggiore di uno, due, tre, quattro o cinque residui.

10 Di conseguenza, gli anticorpi monoclonali anti-LAG-3 isolati qui descritti, o le loro porzioni leganti l'antigene, possono comprendere una regione variabile di catena pesante comprendente: (a) una regione di CDR1 di  $V_H$  comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:1 o una sequenza di amminoacidi avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o aggiunte di amminoacido rispetto a SEQ ID NO:1; (b) una regione di CDR2 di  $V_H$  comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:7 o una sequenza di amminoacidi avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o aggiunte di amminoacido rispetto a SEQ ID NO:7; (c) una regione di CDR3 di  $V_H$  comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:13 o una sequenza di amminoacidi avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o aggiunte di amminoacido rispetto a SEQ ID NO:13; (d) una regione di CDR1 di  $V_L$  comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:19 o una sequenza di amminoacidi avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o aggiunte di amminoacido rispetto a SEQ ID NO:19; (e) una regione di CDR2 di  $V_L$  comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:25 o una sequenza di amminoacidi avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o aggiunte di amminoacido rispetto a SEQ ID NO:25; e (f) una regione di CDR3 di  $V_L$  comprendente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO:31 o una sequenza di amminoacidi avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o aggiunte di amminoacido rispetto a SEQ ID NO:31.

20 Gli anticorpi ingegnerizzati dell'invenzione comprendono quelli in cui le modifiche sono state apportate a residui strutturali all'interno della  $V_H$  e/o della  $V_L$ , ad esempio per migliorare le proprietà dell'anticorpo. Tipicamente, tali modifiche di tipo strutturale vengono effettuate allo scopo di ridurre l'immunogenicità dell'anticorpo. Ad esempio, un approccio prevede di "retromutare" uno o più residui strutturali alla corrispondente sequenza della linea germinale. Più nello specifico, un anticorpo che è andato incontro a mutazione somatica può contenere residui strutturali che divergono da quelli della sequenza della linea germinale da cui l'anticorpo è stato derivato. Tali residui possono essere

25



identificati confrontando le sequenze strutturali dell'anticorpo con le sequenze della linea germinale da cui l'anticorpo è stato derivato.

Ad esempio, la Tabella A mostra regioni in cui una posizione di amminoacido di una regione strutturale (utilizzando il sistema di numerazione di Kabat) diverge dalla linea germinale, e come questa posizione può essere retromutata alla linea germinale attraverso le sostituzioni indicate:

5

Tabella A - Retromutazioni esemplificative		
Regione	Posizione dell'amminoacido strutturale (numerazione di Kabat)	Retromutazione
25E3 V <sub>H</sub>	72	G72R
25E3 V <sub>H</sub>	95	Y95H
25E3 V <sub>H</sub>	97	T97A
25E3 V <sub>H</sub>	98	T98R
25F7 V <sub>H</sub>	69	L69I
25F7 V <sub>H</sub>	71	L71V
25F7 V <sub>H</sub>	83	R83S
25F7 V <sub>H</sub>	97	F97R
8B7 V <sub>H</sub>	76	K76N
8B7 V <sub>H</sub>	79	A79S
8B7 V <sub>H</sub>	83	N83S
8B7 V <sub>H</sub>	112	P112Q
11F2 V <sub>H</sub>	3	D3A
17E5 V <sub>H</sub>	3	H3Q
8B7 V <sub>H</sub>	59	C59Y
8B7 V <sub>H</sub>	59	C59S



Un altro tipo di modifica di tipo strutturale prevede di mutare uno o più residui all'interno della regione strutturale, o anche all'interno di una o più regioni di CDR, allo scopo di rimuovere gli epitopi per le cellule T e dunque ridurre la potenziale immunogenicità dell'anticorpo. Questo approccio è anche identificato come "deimmunizzazione", ed è descritto in ulteriore dettaglio nella pubblicazione di brevetto US 20030153043.

5 In aggiunta o in alternativa alle modifiche apportate all'interno delle regioni strutturali o CDR, gli anticorpi della presente invenzione possono essere progettati in modo da comprendere modifiche all'interno della regione Fc, tipicamente allo scopo di alterare uno o più proprietà funzionali dell'anticorpo come l'emivita nel siero, la fissazione del complemento, il legame al recettore per Fc e/o la citotossicità cellulare antigene-dipendente. Inoltre, sempre allo scopo di alterare uno o più proprietà funzionali dell'anticorpo, un anticorpo dell'invenzione può essere modificato  
10 chimicamente (ad esempio, è possibile attaccare una o più porzioni chimiche all'anticorpo) o può essere modificato in modo tale da alterare la sua glicosilazione. Ciascuna di queste forme esecutive viene descritta sotto in maggiore dettaglio. La numerazione dei residui nella regione Fc è quello dell'indice EU di Kabat.

In una forma esecutiva preferita, l'anticorpo è un anticorpo di isotipo IgG4 comprendente una mutazione da serina a prolina in una posizione che corrisponde alla posizione 228 (S228P; indice EU) nella regione cerniera della  
15 regione costante della catena pesante. Secondo quanto riportato, questa mutazione abolisce l'eterogeneità dei ponti disolfuro inter-catena pesante nella regione cerniera (Angal et al. sopra; la posizione 241 è basata sul sistema di numerazione di Kabat). Ad esempio, in varie forme esecutive, un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione può comprendere la regione variabile di catena pesante di 25F7 (SEQ ID NO:37) collegata ad una regione costante di IgG4 umana in cui la serina in una posizione corrispondente alla posizione 241 descritta in Angal et al., sopra, è stata mutata  
20 in prolina. Così, per la regione variabile della catena pesante di 25F7 collegata ad una regione costante della IgG4 umana, questa mutazione corrisponde ad una mutazione S228P secondo l'indice EU.

In una forma esecutiva, la regione cerniera di CH1 viene modificata in modo da alterare, ad esempio aumentare o diminuire, il numero di residui di cisteina nella regione cerniera. Questo approccio è ulteriormente descritto nel brevetto US 5.677.425. Ad esempio, il numero di residui di cisteina nella regione cerniera di CH1 viene alterato per  
25 facilitare l'assemblaggio delle catene leggere e pesanti, o per aumentare o ridurre la stabilità dell'anticorpo.



In un'altra forma esecutiva, la regione Fc-cerniera di un anticorpo viene mutata allo scopo di accorciare l'emivita biologica dell'anticorpo. Più in particolare, l'introduzione di una o più mutazioni di amminoacido nella regione d'interfaccia tra i domini CH2-CH3 del frammento Fc-cerniera permette di ottenere un anticorpo che mostra un legame indebolito alla proteina A di Staphylococcus (SpA) rispetto al legame a SpA del dominio Fc-cerniera nativo. Questo  
5 approccio è descritto in ulteriore dettaglio nel brevetto US 6.165.745.

In un'altra forma esecutiva, l'anticorpo viene modificato allo scopo di aumentare la sua emivita biologica. Sono possibili vari approcci. Ad esempio, è possibile introdurre una o più delle seguenti mutazioni: T252L, T254S, T256F, come descritto nel brevetto US 6.277.375. In alternativa, per aumentare l'emivita biologica, l'anticorpo può essere alterato all'interno della regione CH1 o CL in maniera tale che esso contenga un epitopo legante il recettore di  
10 salvataggio preso da due anse di un dominio CH2 di una regione Fc di una IgG, come descritto nei brevetti US 5.869.046 e 6.121.022.

In ancora altre forme esecutive, la regione Fc viene alterata sostituendo almeno un residuo di amminoacido con un residuo di amminoacido differente allo scopo di alterare la/le funzioni effettrici dell'anticorpo. Ad esempio, uno o più amminoacidi selezionati dai residui di amminoacido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 possono essere  
15 sostituiti con un residuo di amminoacido differente in maniera tale che l'anticorpo mostri un'affinità alterata per un ligando effettore pur mantenendo la capacità di legame all'antigene dell'anticorpo genitore. Il ligando effettore verso cui viene alterata l'affinità può essere, ad esempio, un recettore per Fc o il componente C1 del complemento. Questo approccio è descritto in ulteriore dettaglio nei brevetti US 5.624.821 e 5.648.260.

In un altro esempio, uno o più amminoacidi selezionati dai residui di amminoacido 329, 331 e 322 possono  
20 essere sostituiti con un residuo di amminoacido differente in maniera tale che l'anticorpo mostri un legame alterato a C1q e/o una citotossicità complemento-dipendente (CDC) ridotta o abolita. Questo approccio è descritto in ulteriore dettaglio nel brevetto US 6.194.551.

In un altro esempio, uno o più residui di amminoacido all'interno delle posizioni di amminoacido 231 e 239  
25 vengono modificati allo scopo di alterare la capacità dell'anticorpo di fissare il complemento. Questo approccio è ulteriormente descritto nella pubblicazione PCT WO 94/29351.



In un altro esempio, per aumentare la capacità dell'anticorpo di mediare la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) e/o per aumentare l'affinità dell'anticorpo nei confronti di un recettore per Fcγ, la regione Fc viene alterata modificando uno o più amminoacidi nelle seguenti posizioni: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419; 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Questo approccio è ulteriormente descritto nella pubblicazione PCT WO 00/42072. Inoltre, i siti leganti sulla IgG1 umana per FcγRI, FcγRII, FcγRIII ed FcRn sono stati mappati, e sono state descritte varianti che mostrano un legame migliorato (vedere Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). È stato mostrato che specifiche mutazioni nelle posizioni 256, 290, 298, 333, 334 e 339 migliorano il legame a FcγRIII. Inoltre, è stato mostrato che i seguenti mutanti di combinazione migliorano il legame a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A ed S298A/E333A/K334A.

In ancora un'altra forma esecutiva, viene modificata la glicosilazione di un anticorpo. Ad esempio, è possibile produrre un anticorpo aglicosilato (nel senso che l'anticorpo è privo di glicosilazione). Ad esempio, la glicosilazione può essere alterata allo scopo di aumentare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Tali modifiche carboidratiche possono essere ottenute, ad esempio, alterando uno o più siti di glicosilazione all'interno della sequenza dell'anticorpo. Ad esempio, è possibile effettuare una o più sostituzioni di amminoacido che determinano l'eliminazione di uno o più siti strutturali di glicosilazione nella regione variabile, così da eliminare la glicosilazione in quel sito. Tale aglicosilazione può aumentare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Vedere ad esempio i brevetti US 5.714.350 e US 6.350.861.

In aggiunta o in alternativa, è possibile produrre un anticorpo avente un tipo alterato di glicosilazione, come un anticorpo ipofucosilato avente quantità ridotte di residui di fucosile o un anticorpo avente un numero aumentato di strutture GlcNAc bisecanti. È stato dimostrato che tali modelli alterati di glicosilazione aumentano la capacità ADCC degli anticorpi. Tali modifiche carboidratiche possono essere ottenute, ad esempio, esprimendo l'anticorpo in una cellula ospite avente un macchinario di glicosilazione alterato. Le cellule con un macchinario di glicosilazione alterato sono state descritte nel ramo, e possono essere usate come cellule ospiti in cui esprimere gli anticorpi ricombinanti dell'invenzione allo scopo di produrre un anticorpo con una glicosilazione alterata. Ad esempio, le linee cellulari



Ms704, Ms705 ed Ms709 sono prive del gene per la fucosiltransferasi FUT8 ( $\alpha$ -(1,6)-fucosiltransferasi), ragione per cui gli anticorpi espressi nelle linee cellulari Ms704, Ms705 ed Ms709 sono privi di fucosio sui loro carboidrati. Le linee cellulari Ms704, Ms705 ed Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> sono state create mediante distruzione mirata del gene FUT8 nelle cellule CHO/DG44 utilizzando due vettori di sostituzione (vedere la pubblicazione di brevetto US 20040110704 e Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614-22). Come altro esempio, EP 1.176.195 descrive una linea cellulare con un gene FUT8 funzionalmente distrutto che codifica per una fucosiltransferasi in maniera tale che, riducendo o eliminando l'enzima correlato al legame  $\alpha$ -1,6, gli anticorpi espressi in tale linea cellulare mostrino uno stato di ipofucosilazione. EP 1.176.195 descrive anche linee cellulari che hanno una bassa attività enzimatica di aggiunta del fucosio alla N-acetilglucosammina che si lega alla regione Fc dell'anticorpo, o che non hanno tale attività enzimatica, ad esempio la linea cellulare di mieloma di ratto YB2/0 (ATCC CRL 1662). La pubblicazione PCT WO 03/035835 descrive una linea variante di cellule CHO, le cellule Lec13, avente una capacità ridotta di attaccare il fucosio ai carboidrati Asn(297)-collegati, sempre con la conseguenza di ipofucosilare gli anticorpi espressi in quella cellula ospite (vedere anche Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Gli anticorpi con un profilo di glicosilazione modificato possono anche essere prodotti in uova di gallina, come descritto nella pubblicazione PCT WO 06/089231. In alternativa, gli anticorpi con un profilo di glicosilazione modificato possono essere prodotti in cellule di pianta, come Lemna. Dei metodi per la produzione di anticorpi in un sistema di pianta sono divulgati nella domanda di brevetto US corrispondente al numero registro mandatario 040989/314911 di Alston & Bird LLP, depositata in data 11 agosto 2006. La pubblicazione PCT WO 99/54342 descrive linee cellulari ingegnerizzate per esprimere glicosiltransferasi modificanti le glicoproteine (ad esempio la  $\beta$ (1,4)-N-acetilglucosamminiltransferasi III (GnTIII)) in maniera tale che gli anticorpi espressi nelle linee cellulari ingegnerizzate mostrino un numero aumentato di strutture GlcNAc biseccanti che determina una maggiore attività ADCC degli anticorpi (vedere anche Umata et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). In alternativa, i residui di fucosio dell'anticorpo possono essere tagliati via utilizzando un enzima di fucosidasi; ad esempio, la fucosidasi  $\alpha$ -L-fucosidasi rimuove i residui di fucosile dagli anticorpi (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).



Un'altra modifica prevista da questa divulgazione per i qui presenti anticorpi è la pegilazione. Ad esempio, un anticorpo può essere pegilato allo scopo di aumentare l'emivita biologica (ad esempio nel siero) dell'anticorpo. Per pegilare un anticorpo, l'anticorpo, o un suo frammento, viene tipicamente fatto reagire con un polietilenglicole (PEG), come un derivato esterico o aldeidico reattivo di un PEG, in condizioni in cui uno o più gruppi PEG si attaccano all'anticorpo o al frammento di anticorpo. Preferibilmente, la pegilazione viene condotta attraverso una reazione di acilazione o una reazione di alchilazione con una molecola reattiva di PEG (o con un polimero idrosolubile reattivo analogo). Nel presente contesto, il termine "polietilenglicole" intende comprendere una qualsiasi delle forme di PEG che sono state usate per funzionalizzare altre proteine, come mono-alcossi- o ariossi-(C1-C10)-polietilenglicole o polietilenglicole-maleimmide. In certe forme esecutive, l'anticorpo da pegilare è un anticorpo aglicosilato. I metodi per pegilare le proteine sono noti nel ramo, e possono essere applicati agli anticorpi dell'invenzione. Vedere ad esempio EP 0154 316 ed EP 0 401 384.

#### Proprietà fisiche degli anticorpi

Gli anticorpi di questa divulgazione possono essere caratterizzati in base alle loro varie proprietà fisiche allo scopo di rilevare e/o differenziare le loro differenti classi.

Gli anticorpi della presente divulgazione possono contenere uno o più siti di glicosilazione sia nella regione variabile della catena leggera che in quella della catena pesante. Tali siti di glicosilazione possono determinare un'immunogenicità aumentata dell'anticorpo o un'alterazione del pK dell'anticorpo a causa del legame alterato all'antigene (Marshall et al. (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41:673-702; Gala e Morrison (2004) *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick et al. (1988) *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol. Immunol.* 37:697-706). Come noto, la glicosilazione avviene in motivi contenenti una sequenza N-X-S/T. In alcuni casi, è preferibile avere un anticorpo anti-LAG-3 che non contiene una glicosilazione a livello di regione variabile. Ciò può essere ottenuto o selezionando anticorpi che non contengono il motivo di glicosilazione nella regione variabile, o mutando residui all'interno della regione di glicosilazione.

In una forma esecutiva preferita, gli anticorpi della presente divulgazione non contengono siti di isomeria dell'asparagina. La deammidazione dell'asparagina può avvenire su sequenze N-G o D-G, e può determinare la



creazione di un residuo di acido isoaspartico che introduce una discontinuità nella catena polipeptidica, diminuendone la stabilità (effetto dell'acido isoaspartico).

5 Ogni anticorpo avrà un unico punto isoelettrico (pI) che, generalmente, ricade nel campo di pH tra 6 e 9,5. Il pI per un anticorpo ad IgG1 ricade tipicamente nel campo di pH di 7-9,5, mentre il pI per un anticorpo ad IgG4 ricade tipicamente nel campo di pH di 6-8. Secondo un'ipotesi, gli anticorpi con un pI al di fuori del campo di normalità possono mostrare un certo grado di denaturazione (srotolamento) e di instabilità in condizioni in vivo. Pertanto, è preferibile avere un anticorpo anti-LAG-3 contenente un valore di pI che ricade nel campo della normalità. Ciò può essere ottenuto o selezionando anticorpi con un pI nel campo della normalità, o mutando dei residui di superficie carichi.

10 Ogni anticorpo avrà una temperatura di fusione caratteristica, con una temperatura di fusione più alta che indica una maggiore stabilità complessiva in vivo (Krishnamurthy R. e Manning M.C. (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:361-71). Generalmente, è preferibile che la  $T_{M1}$  (la temperatura di denaturazione iniziale) sia maggiore di 60°C, preferibilmente maggiore di 65°C, ancora più preferibilmente maggiore di 70°C. Il punto di fusione di un anticorpo può essere misurato adoperando la calorimetria a scansione differenziale (Chen et al. (2003) *Pharm. Res.* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol. Lett.* 68:47-52) o il dicroismo circolare (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

15 In una forma esecutiva preferita, gli anticorpi selezionati sono quelli che non si degradano rapidamente. La degradazione di un anticorpo può essere misurata usando l'elettroforesi capillare (CE) e la MALDI-MS (Alexander A.J. e Hughes D.E. (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32).

20 In un'altra forma esecutiva preferita, gli anticorpi selezionati sono quelli che hanno effetti di aggregazione minimi, i quali possono portare all'innesco di una risposta immunitaria indesiderata e/o a proprietà farmacocinetiche alterate o sfavorevoli. Generalmente, gli anticorpi sono accettabili quando mostrano un'aggregazione di 25% o meno, preferibilmente di 20% o meno, ancora più preferibilmente di 15% o meno, ancora più preferibilmente di 10% o meno, e ancora più preferibilmente di 5% o meno. L'aggregazione può essere misurata attraverso diverse tecniche, tra cui la



colonna di esclusione dimensionale (SEC), la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la dispersione della luce.

Metodi di ingegnerizzazione degli anticorpi

5 Come discusso sopra, gli anticorpi anti-LAG-3 aventi le sequenze di  $V_H$  e di  $V_L$  qui divulgate possono essere usati per creare nuovi anticorpi anti-LAG-3 modificando le sequenze di  $V_H$  e/o di  $V_L$  o la/le regioni costanti ad esse attaccate. Pertanto, le caratteristiche funzionali di un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione, ad esempio di 25F7, vengono usate per creare anticorpi anti-LAG-3 strutturalmente correlati che mantengono almeno una proprietà funzionale degli anticorpi dell'invenzione, come il legame alla LAG-3 umana. Ad esempio, adoperando mezzi ricombinanti, una o più regioni di CDR di 25F7, o di suoi mutanti, possono essere combinate con regioni strutturali note  
10 e/o con altre CDR allo scopo di creare ulteriori anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione che sono anticorpi ingegnerizzati mediante ricombinazione, come discusso sopra. Altri tipi di modifiche comprendono quelle descritte nella sezione che precede. Il materiale di partenza per il metodo di ingegnerizzazione è costituito da una o più delle sequenze di  $V_H$  e/o  $V_L$  qui fornite, o da una o più delle loro regioni di CDR. Per creare l'anticorpo ingegnerizzato, non è necessario preparare effettivamente (ovvero esprimere in forma di proteina) un anticorpo avente una o più delle sequenze di  $V_H$  e/o  
15  $V_L$  qui fornite, o una o più delle loro regioni di CDR. Piuttosto, come materiale di partenza, vengono utilizzate le informazioni contenute nella/nelle sequenze allo scopo di creare una o più sequenze di "seconda generazione" dalla/dalle sequenze originali, procedendo poi a preparare ed esprimere la/le sequenze di "seconda generazione" sotto forma di una proteina.

Di conseguenza, viene qui descritto un metodo per preparare un anticorpo anti-LAG-3 che prevede di:

20 (a) fornire: (i) una sequenza di regione variabile di catena pesante di anticorpo comprendente la sequenza di CDR1 di SEQ ID NO:1, la sequenza di CDR2 di SEQ ID NO:7 e/o la sequenza di CDR3 di SEQ ID NO:13; e/o (ii) una sequenza di regione variabile di catena leggera di anticorpo comprendente la sequenza di CDR1 di SEQ ID NO:19, la sequenza di CDR2 di SEQ ID NO:25 e/o la sequenza di CDR3 di SEQ ID NO:31;



(b) alterare almeno un residuo di amminoacido all'interno della sequenza di regione variabile di catena pesante dell'anticorpo e/o all'interno della sequenza di regione variabile di catena leggera dell'anticorpo allo scopo di creare almeno una sequenza di anticorpo alterata; e

(c) esprimere la sequenza di anticorpo alterata sotto forma di una proteina.

5 Per preparare ed esprimere la sequenza di anticorpo alterata, è possibile utilizzare tecniche standard di biologia molecolare.

Preferibilmente, l'anticorpo codificato dalla/dalle sequenze di anticorpo alterate è uno che mantiene una, alcune o tutte le proprietà funzionali degli anticorpi anti-LAG-3 qui descritti, le quali proprietà funzionali comprendono, ma senza limitazioni:

- 10 (i) un'alta affinità di legame per la LAG-3 umana;  
(ii) il legame ad una LAG-3 di scimmia;  
(iii) l'assenza di legame alla LAG-3 murina;  
(iv) la capacità di inibire il legame di una LAG-3 a molecole MHC di classe II; e/o  
(v) la capacità di stimolare una risposta immunitaria (ad esempio una risposta a cellule T antigene-specifica).

15 Le proprietà funzionali degli anticorpi alterati possono essere valutate adoperando saggi standard disponibili nel ramo e/o qui descritti, come quelli riportati negli Esempi.

In certe forme esecutive dei metodi di ingegnerizzazione degli anticorpi dell'invenzione, le mutazioni possono essere introdotte, a caso o selettivamente, lungo tutta o parte di una sequenza codificante per un anticorpo anti-LAG-3, e gli anticorpi anti-LAG-3 modificati risultanti possono essere sottoposti a screening per valutare la loro attività di legame e/o altre proprietà funzionali qui descritte. I metodi mutazionali sono stati descritti nel ramo (vedere ad esempio le pubblicazioni PCT WO 02/092780 e WO 03/074679).

Molecole di acido nucleico codificanti per gli anticorpi dell'invenzione

25 Un altro aspetto dell'invenzione riguarda molecole di acido nucleico che codificano per gli anticorpi dell'invenzione. Gli acidi nucleici possono essere presenti in cellule intere, in un lisato cellulare, o in una forma parzialmente purificata o sostanzialmente pura. Un acido nucleico è "isolato" o "reso sostanzialmente puro" quando



viene purificato da altri componenti cellulari o da altri contaminanti, ad esempio da altri acidi nucleici cellulari o da altre proteine cellulari, attraverso tecniche standard tra cui un trattamento con agenti alcalini/SDS, la separazione delle bande in CsCl, la cromatografia in colonna, l'elettroforesi su gel di agarosio e altre tecniche ben note nel ramo. Vedere Current Protocols in Molecular Biology, redattori Ausubel, et al. (1987) Greene Publishing & Wiley Interscience, New York. Ad esempio, un acido nucleico dell'invenzione può essere un DNA o un RNA, e può o no contenere sequenze intrinseche. In una forma esecutiva preferita, l'acido nucleico è una molecola di cDNA.

Gli acidi nucleici dell'invenzione possono essere ottenuti adoperando tecniche standard di biologia molecolare. Se gli anticorpi vengono espressi da ibridomi (ad esempio, da ibridomi preparati da topi transgenici portatori di geni immunoglobulinici umani come descritto più sotto), i cDNA codificanti per le catene leggere e pesanti dell'anticorpo prodotto dall'ibridoma possono essere ottenuti attraverso tecniche standard di amplificazione via PCR o di clonazione del cDNA. Se gli anticorpi vengono ottenuti da una libreria di geni immunoglobulinici (ad esempio, adoperando tecniche di esposizione su fago), l'acido nucleico che codifica per tali anticorpi può essere recuperato dalla libreria genica.

Le molecole di acido nucleico preferite dell'invenzione sono quelle codificanti per le sequenze di  $V_H$  e di  $V_L$  dell'anticorpo monoclonale 25F7. Le sequenze di DNA codificanti per le sequenze delle  $V_H$  di 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:49-54. Le sequenze di DNA codificanti per le sequenze delle  $V_L$  di 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 e 17E5 sono rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:55-60.

Una volta ottenuti i frammenti di DNA codificanti per i segmenti  $V_H$  e  $V_L$ , questi frammenti di DNA possono essere ulteriormente manipolati attraverso tecniche standard di DNA ricombinante, ad esempio per convertire i geni di regione variabile in geni di catena di anticorpo di lunghezza integrale, in geni di frammento Fab o in un gene di scFv. In queste manipolazioni, un frammento di DNA codificante per una  $V_L$  o per una  $V_H$  viene operativamente collegato ad un altro frammento di DNA che codifica per un'altra proteina, come una regione costante di anticorpo o un raccordo flessibile. Come usato in questo contesto, il termine "operativamente collegato" intende significare che i due frammenti di DNA sono uniti in maniera tale che le sequenze di amminoacidi codificate dai due frammenti di DNA rimangano in cornice.



Il DNA isolato che codifica per la regione  $V_H$  può essere convertito in un gene di catena pesante di lunghezza integrale collegando operativamente il DNA codificante per la  $V_H$  ad un'altra molecola di DNA che codifica per le regioni costanti della catena pesante (CH1, CH2 e CH3). Le sequenze dei geni umani per le regioni costanti della catena pesante sono note nel ramo (vedere ad esempio Kabat et al. (1991), sopra), e i frammenti di DNA comprendenti queste  
5 regioni possono essere ottenuti mediante amplificazione via PCR standard. La regione costante di catena pesante può essere una regione costante di IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD ma, con preferenza assoluta, è una regione costante di IgG1 o IgG4. Per un gene di frammento Fab-catena pesante, il DNA codificante per la  $V_H$  può essere operativamente collegato ad un'altra molecola di DNA che codifica solamente per la regione costante della catena pesante CH1.

10 Il DNA isolato che codifica per la regione  $V_L$  può essere convertito in un gene di catena leggera di lunghezza integrale (come anche in un gene di Fab-catena leggera di lunghezza integrale) collegando operativamente il DNA codificante per la  $V_L$  ad un'altra molecola di DNA che codifica per la regione costante della catena leggera, CL. Le sequenze dei geni umani per le regioni costanti della catena leggera sono note nel ramo (vedere ad esempio Kabat et al., sopra), e i frammenti di DNA comprendenti queste regioni possono essere ottenuti mediante amplificazione via PCR  
15 standard. In forme esecutive preferite, la regione costante della catena leggera può essere una regione costante kappa o lambda.

Per creare un gene scFv, i frammenti di DNA codificanti per la  $V_H$  e per la  $V_L$  vengono operativamente collegati ad un altro frammento che codifica per un raccordo flessibile, ad esempio che codifica per la sequenza di amminoacidi  $(Gly_4-Ser)_3$ , in maniera tale che le sequenze di  $V_H$  e  $V_L$  possano essere espresse sotto forma di una  
20 proteina a catena singola contigua con le regioni  $V_H$  e  $V_L$  unite per mezzo del raccordo flessibile (vedere ad esempio Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Produzione degli anticorpi monoclonali dell'invenzione

25 Gli anticorpi monoclonali (mAb) della presente divulgazione possono essere prodotti usando la ben nota tecnica di ibridazione delle cellule somatiche (tecnica dell'ibridoma) di Kohler e Milstein (1975) Nature 256:495. Altre



forme esecutive per la produzione degli anticorpi monoclonali comprendono la trasformazione virale od oncogenica dei linfociti B e le tecniche di esposizione su fago. Anche gli anticorpi chimerici o umanizzati sono ben noti nel ramo. Vedere ad esempio i brevetti US 4.816.567; US 5.225.539; US 5.530.101; US 5.585.089; US 5.693.762 e US 6.180.370.

5 In una forma esecutiva preferita, gli anticorpi dell'invenzione sono anticorpi monoclonali umani. Gli anticorpi monoclonali umani diretti contro la LAG-3 umana possono essere generati utilizzando topi transgenici o transcromosomici che recano parti del sistema immunitario umano anziché del sistema murino. Questi topi transgenici e transcromosomici comprendono topi qui rispettivamente identificati come HuMAb Mouse<sup>®</sup> e KM Mouse<sup>®</sup>, e vengono qui collettivamente identificati come "topi ad Ig umane".

10 Il topo HuMAb Mouse<sup>®</sup> (Medarex<sup>®</sup>, Inc.) contiene miniloci per geni immunoglobulinici umani che codificano per sequenze immunoglobuliniche umane non riarrangiate di catena pesante ( $\mu$  e  $\gamma$ ) e di catena leggera  $\kappa$ , oltre che per mutazioni mirate che inattivano i loci endogeni per le catene  $\mu$  e  $\kappa$  (vedere ad esempio Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474):856-859). Di conseguenza, i topi mostrano un'espressione ridotta della IgM o della  $\kappa$  di topo e, in risposta all'immunizzazione, i transgeni umani di catena pesante e leggera introdotti vanno incontro a passaggio di classe e a mutazione somatica, generando anticorpi monoclonali umani a IgG $\kappa$  di alta affinità (Lonberg et al. (1994), sopra; rivisitato in Lonberg (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, e Harding e Lonberg (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparazione e l'uso dei topi HuMAb Mouse<sup>®</sup>, e le modifiche genomiche contenute in tali topi, sono ulteriormente descritti in Taylor et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuaille et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaille et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; e Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. Vedere inoltre i brevetti US 5.545.806; US 5.569.825; US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.789.650; US 5.877.397; US 5.661.016; US 5.814.318; US 5.874.299; US 5.770.429; e US 5.545.807; e le pubblicazioni PCT WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; 20 WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 e WO 01/14424.



5 Gli anticorpi anti-LAG-3 umani possono essere sviluppati utilizzando un topo che reca sequenze immunoglobuliniche umane su transgeni e transcromosomi, come un topo che reca un transgene umano di catena pesante e un transcromosoma umano di catena leggera. Questo topo viene qui identificato come "KM Mouse<sup>®</sup>", ed è descritto in dettaglio nella pubblicazione PCT WO 02/43478. Una forma modificata di questo topo, che comprende  
10 inoltre una distruzione omozigotica del gene endogeno per il recettore FcγRIIB, è anche descritta nella pubblicazione PCT WO 02/43478 ed è qui identificata come "KM/FCGR2D Mouse<sup>®</sup>". Inoltre, è possibile adoperare topi contenenti transgeni di catena pesante di HCo7 o HCo12, o entrambi.

10 Ulteriori forme esecutive di animali transgenici comprendono gli Xenomouse (Abgenix, Inc., brevetti US 5.939.598; US 6.075.181; US 6.114.598; US 6.150.584 e US 6.162.963). Ulteriori forme esecutive comprendono i "topi TC" (Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727) e vacche portatrici di transcromosomi di catene pesanti e leggere umane (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894; pubblicazione PCT WO 02/092812).

15 In alternativa, gli anticorpi anti-LAG-3 monoclonali umani possono essere preparati utilizzando metodi di esposizione su fago per sottoporre a screening librerie di geni immunoglobulinici umani. Vedere ad esempio i brevetti US 5.223.409; US 5.403.484; US 5.571.698; US 5.427.908; US 5.580.717; US 5.969.108; US 6.172.197; US 5.885.793; US 6.521.404; US 6.544.731; US 6.555.313; US 6.582.915; e US 6.593.081.

20 Gli anticorpi anti-LAG-3 monoclonali umani possono anche essere preparati utilizzando topi SCID in cui sono state ricostituite delle cellule immunitarie umane allo scopo di generare, dopo l'immunizzazione, una risposta ad anticorpi umani. Vedere ad esempio i brevetti US 5.476.996 e US 5.698.767.

20 Inoltre, gli anticorpi anti-LAG-3 umani possono essere preparati adoperando l'esposizione su fago, dove i fagi comprendono acidi nucleici che codificano per anticorpi generati in animali transgenici precedentemente immunizzati con LAG-3. Preferibilmente, l'animale transgenico è un topo HuMab, KM o Kirin. Vedere ad esempio il brevetto US 6.794.132.

#### Immunizzazione di topi ad Ig umane

25 I topi ad Ig umane possono essere immunizzati con una preparazione purificata o arricchita di un antigene LAG-3, con una proteina LAG-3 ricombinante, o con cellule che esprimono una proteina LAG-3. Vedere ad esempio



Lonberg et al. (1994), sopra; Fishwild et al.(1996), sopra; pubblicazioni PCT WO 98/24884 o WO 01/14424. Preferibilmente, dei topi di 6-16 settimane vengono immunizzati con 5-50 µg di proteina LAG-3. In alternativa, viene usata una porzione di LAG-3 fusa ad un polipeptide diverso da LAG-3.

5 I topi transgenici possono essere immunizzati con l'antigene LAG-3 per via intraperitoneale (IP) o per via endovenosa (EV) in adiuvante completo di Freund, e possono essere poi sottoposti ad immunizzazioni IP o EV con l'antigene in adiuvante incompleto di Freund. In alternativa, vengono utilizzati adiuvanti diversi dal Freund o cellule intere in assenza di adiuvante. Il plasma può essere sottoposto a screening via ELISA, e le cellule dei topi con titoli sufficienti di immunoglobulina umana anti-LAG-3 possono essere utilizzate per scopi di fusione.

Generazione di ibridomi che producono gli anticorpi monoclonali umani dell'invenzione

10 Per generare ibridomi in grado di produrre anticorpi anti-LAG-3 monoclonali umani, è possibile isolare gli splenociti e/o le cellule di linfonodo di topi immunizzati, e tali splenociti e cellule possono essere fusi con un'opportuna linea di cellule immortalizzate, come una linea cellulare di mieloma murino. Gli ibridomi risultanti possono essere sottoposti a screening per la produzione di anticorpi antigene-specifici. La generazione degli ibridomi è ben nota nel ramo. Vedere ad esempio Harlow e Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications,  
15 New York.

Generazione di trasfettomi che producono gli anticorpi monoclonali dell'invenzione

20 Gli anticorpi dell'invenzione possono essere prodotti in un trasfettoma di cellula ospite utilizzando, ad esempio, una combinazione ben nota nel ramo di tecniche di DNA ricombinante e di metodi di trasfezione genica (ad esempio Morrison, S. (1985) Science 229:1202). In una forma esecutiva, il DNA codificante per le catene leggera e pesante parziali o di lunghezza integrale, ottenuto attraverso tecniche standard di biologia molecolare, viene inserito in uno o più vettori di espressione in maniera tale che i geni siano operativamente collegati a sequenze di regolazione della trascrizione e della traduzione. In questo contesto, il termine "operativamente collegato" intende significare che il gene di un anticorpo viene legato in un vettore in maniera tale che le sequenze di controllo della trascrizione e della traduzione all'interno del vettore svolgano la loro funzione voluta di regolare la trascrizione e la traduzione del gene  
25 dell'anticorpo.



Il termine "sequenza di regolazione" intende comprendere promotori, potenziatori e altri elementi di controllo dell'espressione (ad esempio segnali di poliadenilazione) che controllano la trascrizione o la traduzione dei geni per le catene di anticorpo. Tali sequenze di regolazione sono descritte, ad esempio, in Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Le sequenze regolatrici preferite per l'espressione in cellule ospiti di mammifero comprendono elementi virali che dirigono alti livelli di espressione della proteina nelle cellule di mammifero, come promotori e/o potenziatori derivati dal citomegalovirus (CMV), dal virus di scimmia 40 (SV40), dall'adenovirus (ad esempio il promotore tardivo maggiore di adenovirus (AdMLP)) e dal polioma. In alternativa, è possibile adoperare sequenze di regolazione non virali, come il promotore per l'ubiquitina o il promotore per la  $\beta$ -globina. Ancora ulteriormente, è possibile utilizzare elementi di regolazione costituiti da sequenze di fonti differenti, come il sistema promotore SR $\alpha$  che contiene sequenze del promotore precoce di SV40 e la ripetizione terminale lunga del virus della leucemia umana a cellule T di tipo I (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472). Il vettore di espressione e le sequenze di controllo dell'espressione vengono selezionati in modo da essere compatibili con la cellula ospite usata per l'espressione.


Il gene di catena leggera dell'anticorpo e il gene di catena pesante dell'anticorpo possono essere inseriti nello stesso vettore di espressione o in vettori di espressione separati. In forme esecutive preferite, le regioni variabili vengono usate per creare geni di anticorpo di lunghezza integrale di qualsiasi isotipo di anticorpo, inserendole in vettori di espressione già codificanti per le regioni costanti di catena pesante e di catena leggera dell'isotipo desiderato, in maniera tale che il segmento V<sub>H</sub> sia operativamente collegato al/ai segmenti C<sub>H</sub> all'interno del vettore e il segmento V<sub>L</sub> sia operativamente collegato al segmento C<sub>L</sub> all'interno del vettore. In aggiunta o in alternativa, il vettore di espressione ricombinante può codificare per un peptide segnale che agevola la secrezione della catena di anticorpo da una cellula ospite. Il gene per la catena di anticorpo può essere clonato nel vettore in maniera tale che il peptide segnale sia collegato in cornice all'ammino-terminale del gene per la catena di anticorpo. Il peptide segnale può essere un peptide segnale di immunoglobulina o un peptide segnale eterologo (ovvero un peptide segnale derivato da una proteina diversa da un'immunoglobulina).



Oltre ai geni per le catene di anticorpo e alle sequenze di regolazione, i vettori di espressione ricombinante dell'invenzione possono contenere ulteriori sequenze, come sequenze che regolano la replicazione del vettore nelle cellule ospiti (ad esempio, origini di replicazione) e geni marcatori selezionabili. Il gene marcatore selezionabile facilita la selezione delle cellule ospiti in cui il vettore è stato introdotto (vedere ad esempio i brevetti US 4.399.216; US 4.634.665 e US 5.179.017). Ad esempio, il gene marcatore selezionabile conferisce tipicamente una resistenza a farmaci, come G418, igromicina o metotrexato, in una cellula ospite in cui il vettore è stato introdotto. I geni marcatori selezionabili preferiti comprendono il gene per la diidrofolato riduttasi (DHFR) (da usare in cellule ospiti dhfr- insieme ad una selezione/amplificazione con metotrexato) e il gene neo (per una selezione con G418).

Per l'espressione della catena leggera e della catena pesante, il/i vettori di espressione codificanti per la catena pesante e per la catena leggera vengono trasfettati in una cellula ospite attraverso tecniche standard. Le varie forme del termine "trasfezione" intendono comprendere un'ampia varietà di tecniche comunemente utilizzate per l'introduzione di un DNA esogeno in una cellula ospite procariotica o eucariotica, ad esempio l'elettroporazione, la precipitazione con fosfato di calcio, la trasfezione con DEAE-destrano e simili. Benché gli anticorpi dell'invenzione possano essere teoricamente espressi sia in cellule ospiti procariotiche che in cellule ospiti eucariotiche, l'espressione degli anticorpi nelle cellule eucariotiche e, con preferenza assoluta, in cellule ospiti di mammifero, è quella maggiormente preferita perché tali cellule eucariotiche, e specialmente tali cellule di mammifero, hanno una maggiore probabilità di assemblare e secernere un anticorpo correttamente ripiegato e immunologicamente attivo rispetto alle cellule procariotiche.

Le cellule ospiti di mammifero preferite per l'espressione degli anticorpi ricombinanti dell'invenzione comprendono le cellule di ovaio di criceto cinese (cellule CHO) (incluse le cellule CHO dhfr- descritte in Urlaub e Chasin, (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4216-4220, e usate in combinazione con un marcatore selezionabile per DHFR, ad esempio come descritto in R. J. Kaufman e P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), le cellule di mieloma NSO, le cellule COS e le cellule SP2. In particolare, un altro sistema di espressione preferito per l'uso con le cellule di mieloma NSO è il sistema di espressione genica GS divulgato in WO 87/04462, WO 89/01036 ed EP 338.841. Quando i vettori di espressione ricombinante che codificano per i geni di anticorpo vengono introdotti in cellule ospiti di mammifero, la produzione degli anticorpi viene ottenuta coltivando le cellule ospiti per un periodo di



tempo sufficiente a consentire l'espressione dell'anticorpo nelle cellule ospiti o, più preferibilmente, a consentire la secrezione dell'anticorpo nel terreno di coltura in cui le cellule ospiti vengono fatte crescere. Gli anticorpi possono essere recuperati dal terreno di coltura usando metodi standard di purificazione delle proteine.

Caratterizzazione del legame degli anticorpi all'antigene

5 Il legame degli anticorpi dell'invenzione alla LAG-3 umana può essere esaminato, ad esempio, attraverso un ELISA standard. La reattività delle IgG umane anti-LAG-3 può essere ulteriormente esaminata con un antigene LAG-3 mediante Western blot. La specificità di legame di un anticorpo dell'invenzione può anche essere determinata monitorando il legame dell'anticorpo a cellule che esprimono una proteina LAG-3, ad esempio in citometria di flusso. Questi metodi sono noti nel ramo. Vedere ad esempio Harlow e Lane (1988), citato sopra.

10 Immunoconiugati

Gli anticorpi di questa invenzione possono essere coniugati ad un agente terapeutico per formare un immunoconiugato, come un coniugato anticorpo-farmaco (ADC). Gli agenti terapeutici adatti comprendono antimetaboliti, agenti alchilanti, leganti il solco minore del DNA, intercalanti del DNA, reticolanti del DNA, inibitori delle istone deacetilasi, inibitori dell'esportazione nucleare, inibitori del proteasoma, inibitori della topoisomerasi I o II, inibitori delle proteine da shock termico, inibitori delle tirosin chinasi, antibiotici e agenti anti-mitotici. Nell'ADC, l'anticorpo e l'agente terapeutico sono preferibilmente coniugati per mezzo di un raccordo tagliabile, come un raccordo peptidilico, un raccordo disolfuro o un raccordo di idrazone. Più preferibilmente, il raccordo è un raccordo peptidilico come Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO:15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Gli ADC possono essere preparati come descritto nei brevetti US 20 7.087.600; US 6.989.452; e US 7.129.261; nelle pubblicazioni PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; e WO 08/103693; e nelle pubblicazioni di brevetto US 20060024317; US 20060004081; e US 20060247295.

Molecole bispecifiche

25 In un altro aspetto, la presente divulgazione riguarda molecole bispecifiche comprendenti un anticorpo anti-LAG3 collegato ad almeno un'altra molecola funzionale, ad esempio ad un altro peptide o ad un'altra proteina (ad



esempio, un altro anticorpo o un ligando per un recettore), in modo da generare una molecola bispecifica che si lega ad almeno due siti leganti o molecole bersaglio differenti. Così, nel presente contesto, una "molecola bispecifica" comprende molecole che hanno tre o più specificità. In una forma esecutiva preferita, la molecola bispecifica comprende una prima specificità di legame per LAG-3 e una seconda specificità di legame per una molecola d'innescò che recluta le cellule effettrici citotossiche capaci di uccidere una cellula bersaglio che esprime LAG-3. Esempi di molecole d'innescò adatte sono CD64, CD89, CD16 e CD3. Vedere ad esempio Kufer et al., *TRENDS in Biotechnology*, 22 (5), 238-244 (2004).

In una forma esecutiva, una molecola bispecifica ha, oltre ad una specificità di legame anti-Fc e una specificità di legame anti-LAG-3, anche una terza specificità. La terza specificità può essere per un anti-fattore di potenziamento (EF), ad esempio per una molecola che si lega ad una proteina di superficie coinvolta nell'attività citotossica, aumentando così la risposta immunitaria contro la cellula bersaglio. Ad esempio, l'anti-fattore di potenziamento può legare una cellula T citotossica (ad esempio via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40 o ICAM-1) o un'altra cellula immunitaria, con il risultato di ottenere una risposta immunitaria potenziata contro la cellula bersaglio.

Le molecole bispecifiche possono presentarsi in molti formati e dimensioni differenti. Ad un estremo dello spettro dimensionale, una molecola bispecifica mantiene il formato di un anticorpo tradizionale eccetto per il fatto che, invece di avere due bracci leganti di identica specificità, possiede due bracci leganti ciascuno avente una specificità differente. All'altro estremo si trovano le molecole bispecifiche costituite da due frammenti di anticorpo a catena singola (scFv) collegati per mezzo di una catena peptidica, un cosiddetto costrutto bs(scFv)<sub>2</sub>. Le molecole bispecifiche di dimensione intermedia comprendono due frammenti F(ab) differenti collegati per mezzo di un raccordo peptidilico. Le molecole bispecifiche di questi e altri formati possono essere preparate attraverso l'ingegneria genetica, l'ibridazione somatica o metodi chimici. Vedere ad esempio Kufer et al, citato sopra; Cao e Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998); e van Spriël et al., *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000), e riferimenti citati al loro interno.

#### Composizioni farmaceutiche

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo della presente divulgazione formulato insieme ad un trasportatore farmaceuticamente accettabile. Essa può



opzionalmente contenere uno o più ulteriori ingredienti farmaceuticamente attivi, come un altro anticorpo o un farmaco. Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono anche essere somministrate in una terapia di combinazione con, ad esempio, un altro agente immunostimolante, un agente anti-cancro, un agente antivirale o un vaccino, in maniera tale che l'anticorpo anti-LAG-3 potenzi la risposta immunitaria diretta contro il vaccino.

5           La composizione farmaceutica può comprendere un numero qualsiasi di eccipienti. Gli eccipienti che possono essere utilizzati comprendono trasportatori, agenti tensioattivi, agenti addensanti o emulsionanti, leganti solidi, adiuvanti di dispersione o di sospensione, solubilizzanti, coloranti, agenti aromatizzanti, rivestimenti, agenti disintegranti, lubrificanti, dolcificanti, conservanti, agenti isotonici e loro combinazioni. La selezione e l'uso degli eccipienti adatti sono insegnati in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, redattore Gennaro, 20<sup>a</sup> Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003).

10           Preferibilmente, una composizione farmaceutica è adatta per una somministrazione endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, parenterale, spinale o epidermica (ad esempio per iniezione o infusione). A seconda della via di somministrazione, il composto attivo può essere rivestito con un materiale che lo protegge dall'azione degli acidi e di altre condizioni naturali che possono inattivarlo. Nel presente contesto, la frase "somministrazione parenterale" identifica modalità di somministrazione diverse dalla somministrazione enterica o topica, normalmente tramite iniezione, e comprendono, senza limitazioni, iniezioni e infusioni endovenose, intramuscolari, intrarteriose, intratecali, intracapsulari, intraorbitali, intracardiache, intradermiche, intraperitoneali, transtracheali, sottocutanee, subcuticulari, intrarticolari, subcapsulari, subaracnoidali, intraspinali, epidurali e intrasternali. In alternativa, un anticorpo dell'invenzione può essere somministrato attraverso una via non parenterale, come attraverso una via di somministrazione topica, epidermica o mucosale, ad esempio intranasale, orale, vaginale, rettale, sublinguale o topica.

15           I composti farmaceutici dell'invenzione possono assumere la forma di sali farmaceuticamente accettabili. Un "sale farmaceuticamente accettabile" identifica un sale che mantiene l'attività biologica desiderata del composto genitore senza causare alcun effetto tossicologico indesiderato. Esempi di tali sali comprendono i sali per aggiunta di acido e i sali per aggiunta di base. I sali per aggiunta di acido comprendono quelli derivati da acidi inorganici atossici come acido cloridrico, nitrico, fosforico, solforico, bromidrico, iodidrico, fosforo e simili, come anche da acidi organici

25



atossici come acidi mono- e di-carbossilici alifatici, acidi alcanoici sostituiti con fenile, acidi idrossialcanoici, acidi aromatici, acidi solfonici alifatici e aromatici e simili. I sali per aggiunta di base comprendono quelli derivati da metalli alcalino-terrosi come sodio, potassio, magnesio, calcio e simili, e da ammine organiche atossiche come N,N-dibenziletildiammina, N-metilglucammina, cloroprocaina, colina, dietanolammina, etilendiammina, procaina e simili.

5 Le composizioni farmaceutiche possono prendere la forma di soluzioni o dispersioni acquose sterili. Esse possono essere anche formulate in una microemulsione, in un liposoma, o in un'altra struttura ordinata che è adatta per ottenere un'alta concentrazione del farmaco.

10 La quantità di ingrediente attivo che può essere combinata con un materiale di trasporto allo scopo di produrre una forma di dosaggio singolo varierà a seconda del soggetto trattato e della particolare modalità di somministrazione e, generalmente, sarà quella quantità della composizione che produce un effetto terapeutico. Generalmente, su un totale di cento per cento, questa quantità varierà da circa 0,01% a circa novantanove per cento dell'ingrediente attivo, preferibilmente da circa 0,1% a circa 70%, con preferenza assoluta da circa 1% a circa 30% dell'ingrediente attivo in combinazione con un trasportatore farmaceuticamente accettabile.

15 I regimi di dosaggio vengono regolati in modo da fornire la risposta desiderata ottimale (ad esempio, una risposta terapeutica). Ad esempio, è possibile somministrare un singolo bolo, è possibile somministrare diverse dosi suddivise nel tempo, o è possibile ridurre o aumentare proporzionalmente la dose in base a quanto indicato dalle esigenze della situazione terapeutica. Per promuovere la somministrazione e l'uniformità di dosaggio, è particolarmente vantaggioso formulare le composizioni parenterali in una forma di dosaggio unitario. Nel presente contesto, una forma di dosaggio unitario identifica unità fisicamente discrete che sono idonee come dosaggi unitari per i soggetti da trattare;

20 ciascuna unità contenendo una quantità predeterminata di un composto attivo, calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il trasportatore farmaceutico richiesto. In alternativa, l'anticorpo può essere somministrato in una formulazione a rilascio prolungato, nel qual caso è richiesta una somministrazione meno frequente.

25 Per la somministrazione dell'anticorpo, il dosaggio varia da circa 0,0001 a 100 mg/kg e, più generalmente, da 0,01 a 5 mg/kg di peso corporeo dell'ospite. Ad esempio, i dosaggi possono essere 0,3 mg/kg di peso corporeo, 1 mg/kg



di peso corporeo, 3 mg/kg di peso corporeo, 5 mg/kg di peso corporeo o 10 mg/kg di peso corporeo, o all'interno del campo di 1-10 mg/kg. Un regime di trattamento esemplificativo prevede una somministrazione una volta alla settimana, una volta ogni due settimane, una volta ogni tre settimane, una volta ogni quattro settimane, una volta al mese, una volta ogni 3 mesi, o una volta ogni tre - 6 mesi. I regimi di dosaggio preferiti per un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione comprendono 1 mg/kg di peso corporeo o 3 mg/kg di peso corporeo mediante somministrazione endovenosa, con l'anticorpo che viene fornito utilizzando uno dei seguenti programmi di dosaggio: (i) ogni quattro settimane per sei dosaggi, poi ogni tre mesi; (ii) ogni tre settimane; (iii) una dose una tantum di 3 mg/kg peso corporeo, seguita da 1 mg/kg peso corporeo ogni tre settimane. In alcuni metodi, il dosaggio viene regolato in modo da ottenere una concentrazione dell'anticorpo nel plasma di circa 1-1000 µg/ml e, in alcuni metodi, di circa 25-300 µg/ml.

Una "dose terapeuticamente efficace" di un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione determina preferibilmente una diminuzione della severità dei sintomi della malattia, un aumento della frequenza e della durata dei periodi senza sintomi della malattia, o la prevenzione di un deterioramento o di una disabilità causato/a dall'afflizione della malattia. Ad esempio, per il trattamento di soggetti portatori di un tumore, una "dose terapeuticamente efficace" inibisce la crescita del tumore preferibilmente di almeno 20%, più preferibilmente di almeno 40%, ancora più preferibilmente di almeno 60%, e ancora più preferibilmente di almeno 80% rispetto a soggetti non trattati. Una quantità terapeuticamente efficace di un composto terapeutico può ridurre la dimensione del tumore o comunque migliorare i sintomi in un soggetto, il quale è tipicamente un essere umano o può anche essere un altro mammifero.

La composizione farmaceutica può essere una formulazione a rilascio controllato, tra cui impianti, cerotti transdermici e sistemi di somministrazione microincapsulati. È possibile utilizzare polimeri biocompatibili e biodegradabili come etilene-vinil acetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri e acido polilattico. Vedere ad esempio Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, redattore J.R. Robinson, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Le composizioni terapeutiche possono essere somministrate tramite dispositivi medicali come (1) dispositivi di iniezione ipodermica senza ago (ad esempio US 5.399.163; US 5.383.851; US 5.312.335; US 5.064.413; US 4.941.880; US 4.790.824; e US 4.596.556); (2) pompe di micro-infusione (US 4.487.603); (3) dispositivi transdermici (US



4.486.194); (4) apparati di infusione (US 4.447.233 e US 4.447.224); e (5) dispositivi osmotici (US 4.439.196 e US 4.475.196).

In certe forme esecutive, gli anticorpi monoclonali umani dell'invenzione possono essere formulati in maniera tale da garantire una loro opportuna distribuzione in vivo. Ad esempio, per garantire che i composti terapeutici dell'invenzione attraversino la barriera emato-encefalica, essi possono essere formulati in liposomi che possono inoltre comprendere porzioni di localizzazione per potenziare il trasporto selettivo in specifiche cellule o in specifici organi. Vedere ad esempio US 4.522.811; US 5.374.548; US 5.416.016; e US 5.399.331; V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685; Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Common. 153:1038; Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180; Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134; Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090; Keinanen e Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; e Killion e Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

#### Usi e metodi dell'invenzione

Gli anticorpi, le composizioni anticorpali e i metodi della presente invenzione presentano numerose utilità in vitro e in vivo tra cui, ad esempio, il rilevamento di LAG-3 o il potenziamento di una risposta immunitaria attraverso il blocco di LAG-3. In una forma esecutiva preferita, gli anticorpi della presente invenzione sono anticorpi anti-LAG-3. Ad esempio, tali molecole possono essere somministrate a cellule in coltura, ad esempio in vitro o ex vivo, o a soggetti umani, ad esempio in vivo, allo scopo di potenziare l'immunità in una varietà di situazioni. Di conseguenza, in un aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo dell'invenzione, o una sua porzione legante l'antigene, da usare in un metodo per modificare una risposta immunitaria in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo dell'invenzione, o la sua porzione legante l'antigene, in maniera tale da modificare la risposta immunitaria nel soggetto. Preferibilmente, la risposta viene potenziata, stimolata o sovraregolata.

I soggetti preferiti comprendono pazienti umani bisognosi di potenziare una risposta immunitaria. I metodi sono particolarmente adatti per il trattamento di pazienti umani aventi un disturbo che può essere trattato intensificando una risposta immunitaria (ad esempio la risposta immunitaria mediata dalle cellule T). In una forma esecutiva particolare, i metodi sono particolarmente adatti per il trattamento di un cancro in vivo. Per ottenere un potenziamento



antigene-specifico dell'immunità, gli anticorpi anti-LAG-3 possono essere somministrati insieme ad un antigene d'interesse, o l'antigene può essere già presente nel soggetto da trattare (come nel caso di un soggetto portatore di un tumore o portatore di un virus). Quando gli anticorpi diretti contro LAG-3 vengono somministrati insieme ad un altro agente, i due possono essere somministrati in qualsiasi ordine o simultaneamente.

5 L'invenzione fornisce inoltre metodi per rilevare la presenza dell'antigene LAG-3 umano in un campione, o per misurare la quantità dell'antigene LAG-3 umano, che prevedono di mettere in contatto il campione, e un campione di controllo, con un anticorpo monoclonale umano, o con una sua porzione legante l'antigene, che si lega specificatamente alla LAG-3 umana, in condizioni che permettono la formazione di un complesso tra l'anticorpo o la sua porzione e la LAG-3 umana. Viene poi rilevata la formazione di un complesso, in cui una differenza nella formazione del complesso tra il campione e il campione di controllo è indicativa della presenza dell'antigene LAG-3 umano nel campione. Inoltre, gli anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione possono essere usati per purificare la LAG-3 umana mediante purificazione per immunoaffinità.

15 Data la capacità degli anticorpi anti-LAG-3 dell'invenzione di inibire il legame di LAG-3 alle molecole MHC di classe II e di stimolare risposte a cellule T antigene-specifiche, gli anticorpi dell'invenzione possono essere anche utilizzati in metodi in vitro e in vivo allo scopo di stimolare, potenziare o sovraregolare le risposte a cellule T antigene-specifiche. Ad esempio, un anticorpo dell'invenzione può essere usato in un metodo per stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica che prevede di mettere in contatto detta cellula T con l'anticorpo dell'invenzione in maniera tale da stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica. Per misurare la risposta a cellule T antigene-specifica, è possibile adoperare qualsiasi indicatore adatto di una risposta a cellule T antigene-specifica. Esempi non limitativi di tali indicatori adatti comprendono una proliferazione aumentata delle cellule T in presenza dell'anticorpo, e/o una produzione aumentata di citochine in presenza dell'anticorpo. In una forma esecutiva preferita, viene stimolata la produzione di interleuchina-2 da parte della cellula T antigene-specifica.

25 L'invenzione fornisce anche un anticorpo dell'invenzione da usare in un metodo per stimolare una risposta immunitaria (ad esempio una risposta a cellule T antigene-specifica) in un soggetto, che prevede di somministrare l'anticorpo dell'invenzione al soggetto in maniera tale da stimolare una risposta immunitaria (ad esempio una risposta a



cellule T antigene-specifica) nel soggetto. In una forma esecutiva preferita, il soggetto è un soggetto portatore di un tumore, e la risposta stimolata è una risposta immunitaria contro il tumore. In un'altra forma esecutiva preferita, il soggetto è un soggetto portatore di un virus, e la risposta stimolata è una risposta immunitaria contro il virus.

5 In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo dell'invenzione da usare in un metodo per inibire la crescita di cellule tumorali in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo dell'invenzione in maniera tale da inibire la crescita del tumore nel soggetto. In ancora un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo dell'invenzione da usare in un metodo per trattare un'infezione virale in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo dell'invenzione in maniera tale da trattare l'infezione virale nel soggetto.

Questi e altri usi dell'invenzione sono discussi sotto in ulteriore dettaglio.

10 Cancro

Il blocco di LAG-3 esercitato dagli anticorpi è in grado di potenziare la risposta immunitaria contro le cellule cancerogene nel paziente. In un aspetto, la presente invenzione riguarda un anticorpo dell'invenzione da usare nel trattamento di un soggetto in vivo in maniera tale da inibire la crescita di tumori cancerogeni. Un anticorpo anti-LAG-3 può essere adoperato da solo per inibire la crescita di tumori cancerogeni. In alternativa, un anticorpo anti-CTLA-4 può essere utilizzato in associazione con altri agenti immunogenici, trattamenti anti-cancro standard o altri anticorpi, come descritto sotto.

20 Di conseguenza, in una forma esecutiva, l'invenzione fornisce un anticorpo dell'invenzione, o una sua porzione legante l'antigene, da usare in un metodo per inibire la crescita di cellule tumorali in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto una quantità terapeuticamente efficace dell'anticorpo anti-LAG-3 o della sua porzione legante l'antigene. Preferibilmente, l'anticorpo è un anticorpo anti-CTLA-4 umano (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-LAG-3 umana umani qui descritti). In aggiunta o in alternativa, l'anticorpo può essere un anticorpo anti-LAG-3 chimerico o umanizzato.

25 I cancro preferiti la cui crescita può essere inibita attraverso l'uso degli anticorpi dell'invenzione comprendono cancro tipicamente responsivi ad un'immunoterapia. Esempi non limitativi di cancro preferiti per il trattamento comprendono il melanoma (ad esempio un melanoma metastatico maligno), il cancro del rene (ad esempio un



carcinoma a cellule chiare), il cancro della prostata (ad esempio un adenocarcinoma della prostata refrattario agli ormoni), il cancro della mammella, il cancro del colon e il cancro del polmone (ad esempio un cancro del polmone non a piccole cellule). Inoltre, l'invenzione comprende neoplasie maligne refrattarie o ricorrenti la cui crescita può essere inibita attraverso l'uso degli anticorpi dell'invenzione.

5           Esempi di altri cancri che possono essere trattati adoperando gli anticorpi dell'invenzione, o le loro porzioni leganti l'antigene, comprendono cancro delle ossa, cancro del pancreas, cancro della pelle, cancro di testa e collo, melanoma maligno cutaneo o intraoculare, cancro dell'utero, cancro dell'ovaio, cancro del retto, cancro della regione anale, cancro dello stomaco, cancro dei testicoli, carcinoma delle tube di Falloppio, carcinoma dell'endometrio, carcinoma della cervice, carcinoma della vagina, carcinoma della vulva, morbo di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, 10 cancro dell'esofago, cancro dell'intestino tenue, cancro del sistema endocrino, cancro della ghiandola tiroidea, cancro della ghiandola paratiroidea, cancro della ghiandola surrenale, sarcoma dei tessuti molli, cancro dell'uretra, cancro del pene, leucemie croniche o acute tra cui leucemia mieloide acuta, leucemia mieloide cronica, leucemia linfoblastica acuta, leucemia linfocitica cronica, tumori solidi dell'infanzia, linfoma linfocitico, cancro della vescica, cancro del rene o dell'uretere, carcinoma della pelvi renale, neoplasia del sistema nervoso centrale (SNC), linfoma primario del SNC, 15 angiogenesi tumorale, tumore dell'asse spinale, glioma del tronco cerebrale, adenoma dell'ipofisi, sarcoma di Kaposi, cancro epidermoide, carcinoma a cellule squamose, linfoma a cellule T, cancri provocati dall'ambiente, inclusi quelli indotti dall'amianto, e combinazioni di detti cancri. La presente invenzione è anche utile per il trattamento di cancri metastatici, specialmente di cancri metastatici che esprimono PD-L1 (Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17:133-144).

20           Opzionalmente, gli anticorpi anti-LAG-3 possono essere combinati con un agente immunogenico, come cellule cancerogene, antigeni tumorali purificati (tra cui proteine ricombinanti, peptidi e molecole carboidratiche), cellule, e cellule trasfettate con geni codificanti per citochine immunostimolanti (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Esempi non limitativi di vaccini tumorali che possono essere usati comprendono peptidi di antigeni di melanoma, come peptidi di gp100, antigeni di MAGE, Trp-2, MART1 e/o tirosinasi, o cellule tumorali trasfettate per esprimere la citochina GM-CSF (discusso ulteriormente sotto).



Negli esseri umani, è stato mostrato che certi tumori, come i melanomi, sono immunogenici. Aumentando la soglia di attivazione delle cellule T attraverso il blocco di LAG-3, è possibile attivare delle risposte contro il tumore nell'ospite.

5 È probabile che il blocco di LAG-3 sia più efficace quando combinato con un protocollo di vaccinazione. Sono state ideate molte strategie sperimentali per la vaccinazione contro i tumori (vedere Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; vedere anche Restifo, N. e Sznol, M., Cancer Vaccines, Cap. 61, pagg. 3023-3043 in DeVita et al. (redattori), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Quinta Edizione). In una di queste strategie, un vaccino viene  
10 preparato utilizzando cellule tumorali autologhe o allogeniche. È stato mostrato che questi vaccini cellulari mostrano la loro massima efficacia quando le cellule tumorali vengono trasdotte per esprimere GM-CSF. È stato mostrato che GM-CSF è un potente attivatore della presentazione dell'antigene per la vaccinazione tumorale (Dranoff et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 90: 3539-43).

15 Lo studio dell'espressione genica e dei modelli di espressione genica su larga scala in vari tumori ha portato a definire i cosiddetti antigeni tumore-specifici (Rosenberg, S.A. (1999) Immunity 10:281-7). In molti casi, questi antigeni tumore-specifici sono antigeni di differenziazione che vengono espressi nei tumori e nelle cellule da cui il tumore nasce, ad esempio gli antigeni dei melanociti gp100, gli antigeni MAGE e Trp-2. Cosa più importante, è possibile dimostrare che molti di questi antigeni sono il bersaglio di cellule T tumore-specifiche presenti nell'ospite. Il blocco di LAG-3 può essere utilizzato in combinazione con una collezione di proteine e/o di peptidi ricombinanti  
20 espressi in un tumore allo scopo di generare una risposta immunitaria contro queste proteine. Queste proteine vengono normalmente viste dal sistema immunitario come antigeni self e, pertanto, vengono tollerate. L'antigene tumorale può comprendere la proteina telomerasi, che è necessaria per la sintesi dei telomeri nei cromosomi e che viene espressa in più di 85% dei cancro umani e solo in un numero limitato di tessuti somatici (Kim et al. (1994) Science 266:2011-2013) (questi tessuti somatici possono essere protetti da un attacco immunitario attraverso vari mezzi). Gli antigeni tumorali  
25 possono anche essere "neo-antigeni" espressi nelle cellule cancerogene a causa di mutazioni somatiche che alterano la



sequenza della proteina o creano proteine di fusione tra due sequenze non correlate (ad esempio bcr-abl nel cromosoma Philadelphia), o possono essere idiotipici per i tumori a cellule B.

Altri vaccini tumorali possono comprendere le proteine di virus coinvolti in cancro umano, come il virus del papilloma umano (HPV), il virus dell'epatite (HBV e HCV) e l'herpesvirus del sarcoma di Kaposi (KHSV). Un'altra  
5 forma di antigene tumore-specifico che può essere utilizzata in combinazione con il blocco di LAG-3 è costituita dalle proteine da shock termico (HSP) isolate dallo stesso tessuto tumorale e purificate. Queste proteine da shock termico contengono frammenti di proteine delle cellule tumorali, e queste HSP sono altamente efficaci in termini di distribuzione alle cellule di presentazione dell'antigene per suscitare un'immunità tumorale (Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120).

10 Le cellule dendritiche (DC) sono potenti cellule di presentazione dell'antigene che possono essere utilizzate per innescare risposte antigene-specifiche. Le DC possono essere prodotte ex vivo e caricate sia con vari antigeni proteici e peptidici che con vari estratti di cellule tumorali (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4:328-332). Le DC possono anche essere trasdotte, attraverso mezzi genetici, in modo da esprimere pure questi antigeni tumorali. Le DC sono stati direttamente fuse alle cellule tumorali per scopi di immunizzazione (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336).  
15 Come metodo di vaccinazione, l'immunizzazione a DC può essere efficacemente combinata con il blocco di LAG-3 allo scopo di attivare risposte antitumorali più potenti.

Il blocco di LAG-3 può anche essere combinato con trattamenti standard per il cancro. Il blocco di LAG-3 può essere efficacemente combinato con regimi chemioterapici. In questi casi, è possibile ridurre la dose di reagente chemioterapico che viene somministrata (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Un esempio di tale  
20 combinazione è un anticorpo anti-LAG-3 in combinazione con la dacarbazina per il trattamento di un melanoma. Un altro esempio di tale combinazione è un anticorpo anti-LAG-3 in combinazione con l'interleuchina-2 (IL-2) per il trattamento di un melanoma. La giustificazione scientifica dietro l'uso combinato di un blocco di LAG-3 con la chemioterapia è che la morte delle cellule, una conseguenza dell'azione citotossica della maggior parte dei composti chemioterapici, genererà livelli aumentati di antigene tumorale nella via di presentazione dell'antigene. Altre terapie di  
25 combinazione che possono dare luogo ad una sinergia con il blocco di LAG-3 attraverso la morte delle cellule sono la



radiazione, la chirurgia e la deprivazione ormonale. Ciascuno di questi protocolli crea una fonte di antigene tumorale nell'ospite. Anche gli inibitori dell'angiogenesi possono essere combinati con il blocco di LAG-3. L'inibizione dell'angiogenesi causa la morte delle cellule tumorali, ottenendo un antigene tumorale che può essere alimentato nelle vie di presentazione dell'antigene dell'ospite.

5           Gli anticorpi bloccanti anti-LAG-3 possono anche essere adoperati in combinazione con anticorpi bispecifici capaci di localizzare le cellule effettrici che esprimono i recettori per Fc $\alpha$  o Fc $\gamma$  sulle cellule tumorali (vedere ad esempio i brevetti US 5.922.845 e US 5.837.243). Gli anticorpi bispecifici possono essere usati per prendere a bersaglio due antigeni separati. Ad esempio, gli anticorpi bispecifici anti-recettore per Fc/anti-antigene tumorale (ad esempio Her-2/neu) sono stati usati per localizzare i macrofagi in siti tumorali. Questa localizzazione può attivare delle risposte  
10 tumore-specifiche in maniera più efficace. Il braccio a cellule T di queste risposte verrà accresciuto dall'uso del blocco di LAG-3. In alternativa, l'antigene può essere direttamente distribuito alle DC tramite l'uso di anticorpi bispecifici che si legano all'antigene tumorale e ad un marcatore di superficie cellulare che è specifico per le cellule dendritiche.

I tumori eludono la sorveglianza immunitaria dell'ospite tramite una grande varietà di meccanismi. Molti di questi meccanismi possono essere superati attraverso l'inattivazione di proteine che vengono espresse dai tumori e che  
15 sono immunosoppressive. Queste comprendono, tra le altre, TGF- $\beta$  (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200) e il ligando Fas (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). Adoperando degli anticorpi diretti contro ciascuna di queste entità in combinazione con un anti-LAG-3, è possibile neutralizzare gli effetti degli agenti immunosoppressivi e favorire le risposte immunitarie esercitate dall'ospite contro il tumore.

20           Un anti-LAG-3 può essere adoperato in combinazione con altri anticorpi che attivano la responsività immunitaria dell'ospite. Questi comprendono molecole, presenti sulla superficie delle cellule dendritiche, che attivano la funzione delle DC e la presentazione dell'antigene. Gli anticorpi anti-CD40 sono in grado di rimpiazzare efficacemente l'attività delle cellule T helper (Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478), e possono essere utilizzati in combinazione con gli anticorpi anti-LAG-3 (Ito et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40). Anche gli anticorpi attivanti diretti  
25 contro molecole costimolatorie delle cellule T, come CTLA-4 (ad esempio, brevetto US 5.811.097), OX-40 (Weinberg



et al. (2000) Immunol. 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266) possono fornire livelli aumentati di attivazione delle cellule T.

5 Il trapianto di midollo osseo viene attualmente utilizzato per il trattamento di una varietà di tumori di origine emopoietica. Benché una conseguenza di questo trattamento sia la malattia dell'innesto contro l'ospite, è possibile trarre un beneficio terapeutico dalle risposte dell'innesto contro il tumore. Il blocco di LAG-3 può essere usato per aumentare l'efficacia delle cellule T tumore-specifiche innestate dal donatore.

10 Esistono inoltre diversi protocolli di trattamento sperimentale che prevedono l'attivazione e l'espansione ex vivo di cellule T antigene-specifiche e il trasferimento adottivo di queste cellule in riceventi allo scopo di stimolare la produzione di cellule T antigene-specifiche contro un tumore (Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-51). Questi metodi possono essere anche utilizzati per attivare delle risposte a cellule T nei confronti di agenti infettivi, come CMV. L'attivazione ex vivo in presenza degli anticorpi anti-LAG-3 può aumentare la frequenza e l'attività delle cellule T che vengono sottoposte a trasferimento adottivo.

#### Malattie infettive

15 L'invenzione è anche utile per il trattamento di pazienti che sono stati esposti a particolari tossine o patogeni. Di conseguenza, viene qui descritto un metodo per trattare una malattia infettiva in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione, o una sua porzione legante l'antigene, in maniera tale da trattare il soggetto per la malattia infettiva. Preferibilmente, l'anticorpo è un anticorpo anti-LAG-3 umana umano (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-LAG-3 umani qui descritti). In aggiunta o in alternativa, l'anticorpo può essere un anticorpo chimerico o umanizzato.

20 In maniera simile alla sua applicazione nei tumori come discusso sopra, il blocco di LAG-3 mediato dall'anticorpo può essere usato da solo, o come adiuvante in combinazione con vaccini, allo scopo di stimolare la risposta immunitaria nei confronti dei patogeni, delle tossine e degli antigeni self. Esempi di patogeni per cui questo approccio terapeutico può essere particolarmente utile comprendono i patogeni per cui non esiste attualmente un vaccino efficace, o i patogeni per cui i vaccini tradizionali sono meno che completamente efficaci. Questi comprendono, 25 ma senza limitazioni, HIV, epatite (A, B e C), Influenza, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania, Staphylococcus aureus,



*Pseudomonas aeruginosa*. Il blocco di LAG-3 è particolarmente utile contro infezioni stabilite da agenti, come HIV, che presentano antigeni alterati durante il corso delle infezioni. Questi nuovi epitopi vengono riconosciuti come estranei al momento della somministrazione dell'anti-LAG-3 umana, provocando così una forte risposta a cellule T che non viene attenuata dai segnali negativi trasmessi attraverso LAG-3.

5           Alcuni esempi di virus patogeni responsabili di infezioni che possono essere trattate attraverso i metodi qui descritti comprendono HIV, epatite (A, B o C), herpesvirus (ad esempio VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II e CMV, virus di Epstein Barr), adenovirus, virus dell'influenza, flavivirus, ecovirus, rinovirus, coxsackievirus, coronavirus, virus sinciziale respiratorio, virus della parotite, rotavirus, virus del morbillo, virus della rosolia, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus della dengue, papillomavirus, virus del mollusco, poliovirus, virus della rabbia, virus JC e virus  
10 dell'encefalite arbovirale.

Alcuni esempi di batteri patogeni responsabili di infezioni che possono essere trattate attraverso i metodi qui descritti comprendono clamidia, batteri rickettsie, micobatteri, stafilococchi, streptococchi, pneumococchi, meningococchi e gonococchi, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difterite, salmonella, bacilli, colera, tetano, botulismo, antrace, peste, leptospirosi e batteri della malattia di Lyme.

15           Alcuni esempi di funghi patogeni responsabili di infezioni che possono essere trattate attraverso i metodi qui descritti comprendono *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, ecc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, ecc.), il genere *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

20           Alcuni esempi di parassiti patogeni responsabili di infezioni che possono essere trattate attraverso i metodi qui descritti comprendono *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

In tutti i metodi di sopra, il blocco di LAG-3 può essere combinato con altre forme di immunoterapia, come un trattamento con citochine (ad esempio interferoni, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o una terapia a base di anticorpi bispecifici,



che forniscono una migliore presentazione degli antigeni tumorali (vedere ad esempio Holliger (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

#### Reazioni autoimmuni

5 Gli anticorpi anti-LAG-3 possono provocare e amplificare le risposte autoimmuni. In effetti, l'induzione di risposte antitumorali basata sull'uso di vaccini a cellule e peptidi tumorali rivela che molte risposte antitumorali coinvolgono reattività anti-self (van Elsas et al. (2001) J. Exp. Med. 194:481-489; Overwijk, et al. (1999) Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 96:2982-2987; Hurwitz, (2000) sopra; Rosenberg & White (1996) J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19(1):81-4). Di conseguenza, è possibile prendere in considerazione l'utilizzo di un blocco con un anti-LAG-3 in combinazione con varie proteine self allo scopo di escogitare protocolli di vaccinazione capaci di generare  
10 efficacemente delle risposte immunitarie contro queste proteine self per il trattamento di malattie. Ad esempio, il morbo di Alzheimer causa un accumulo inappropriato di peptide A $\beta$  nei depositi di amiloide del cervello; le risposte ad anticorpi contro l'amiloide sono in grado di rimuovere questi depositi di amiloide (Schenk et al., (1999) Nature 400:173-177).

15 I bersagli usati possono anche essere altre proteine self, come IgE per il trattamento di allergia e asma e TNF $\alpha$  per l'artrite reumatoide. Infine, attraverso l'uso di anticorpi anti-LAG-3, è possibile indurre delle risposte ad anticorpi contro vari ormoni. Le risposte ad anticorpi neutralizzanti contro gli ormoni riproduttivi possono essere utilizzate per scopo di contraccezione. Anche una risposta ad anticorpi neutralizzanti contro ormoni e altri fattori solubili che sono richiesti per la crescita di particolari tumori può essere considerata un possibile obiettivo di una vaccinazione.

20 Adoperando dei metodi analoghi a quelli descritti sopra per l'uso di un anticorpo anti-LAG-3, è possibile indurre risposte autoimmuni terapeutiche per il trattamento di pazienti aventi un accumulo inappropriato di altri antigeni self, come depositi di amiloide, tra cui A $\beta$  nel morbo di Alzheimer, citochine come TNF $\alpha$ , e IgE.

#### Vaccini

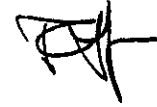
25 Gli anticorpi anti-LAG-3 possono essere utilizzati per stimolare delle risposte immunitarie antigene-specifiche attraverso la co-somministrazione di un anticorpo anti-LAG-3 e di un antigene d'interesse (ad esempio un vaccino). Di conseguenza, in un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-LAG-3 dell'invenzione, o una sua porzione



legante l'antigene, da usare in un metodo per potenziare una risposta immunitaria ad un antigene in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto: (i) l'antigene; e (ii) l'anticorpo anti-LAG-3 o la sua porzione legante l'antigene, in maniera tale da potenziare una risposta immunitaria contro l'antigene nel soggetto. Preferibilmente, l'anticorpo è un anticorpo anti-LAG-3 umana umano (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-LAG-3 umani qui descritti). In aggiunta o  
5 in alternativa, l'anticorpo può essere un anticorpo chimerico o umanizzato. L'antigene può ad esempio essere un antigene tumorale, un antigene virale, un antigene batterico o un antigene di un patogeno. Esempi non limitativi di tali antigeni comprendono quelli discussi nelle sezioni precedenti, come gli antigeni tumorali (o i vaccini tumorali) discussi sopra, o antigeni dei virus, dei batteri o degli altri agenti patogeni descritti sopra.

Le vie di somministrazione adatte per le composizioni anticorpali dell'invenzione in vivo e in vitro (ad esempio anticorpi monoclonali umani, molecole multispecifiche e bispecifiche, e immunoconiugati) sono ben note nel ramo e  
10 possono essere selezionate dalle persone di competenza ordinaria. Ad esempio, le composizioni anticorpali possono essere somministrate per iniezione (ad esempio per via endovenosa o sottocutanea). I dosaggi adatti delle molecole utilizzate dipenderanno dall'età e dal peso del soggetto, e dalla concentrazione e/o dalla formulazione della composizione anticorpale.

Come già descritto, gli anticorpi anti-LAG-3 umani dell'invenzione possono essere co-somministrati insieme ad uno o più altri agenti terapeutici, ad esempio un agente citotossico, un agente radiotossico o un agente immunosoppressivo. L'anticorpo può essere collegato all'agente (in un immunocomplesso) o può essere somministrato separatamente dall'agente. In quest'ultimo caso (somministrazione separata), l'anticorpo può essere somministrato  
15 prima, dopo o simultaneamente all'agente, o può essere co-somministrato insieme ad altre terapie note, ad esempio una terapia anti-cancro, ad esempio una radiazione. Tali agenti terapeutici comprendono, tra gli altri, agenti anti-neoplastici come doxorubicina (adriamicina), cisplatino, bleomicina solfato, carmustina, clorambucile, dacarbazina, ciclofosfamide e idrossiurea che, da soli, sono solamente efficaci a livelli che sono tossici o sub-tossici per un  
20 paziente. Il cisplatino viene somministrato per via endovenosa ad una dose di 100 mg/ml una volta ogni quattro settimane, mentre l'adriamicina viene somministrata per via endovenosa ad una dose di 60-75 mg/ml una volta ogni 21  
25 giorni. La co-somministrazione degli anticorpi anti-LAG-3 umani della presente invenzione, o dei loro frammenti



leganti l'antigene, insieme ad agenti chemioterapici, fornisce due agenti anti-cancro che operano attraverso meccanismi differenti e che producono un effetto citotossico sulle cellule tumorali umane. Tale co-somministrazione può risolvere i problemi dovuti allo sviluppo di una resistenza ai farmaci o ad un cambiamento di antigenicità nelle cellule tumorali che le renderebbe non reattive all'anticorpo.

5 L'ambito della presente invenzione circoscrive anche kit comprendenti le composizioni anticorpali dell'invenzione (ad esempio anticorpi umani, molecole bispecifiche o multispecifiche, o immunoconiugati) e istruzioni per l'uso. Il kit può inoltre contenere almeno un reagente addizionale o uno o più ulteriori anticorpi umani dell'invenzione (ad esempio, un anticorpo umano avente un'attività complementare che si lega ad un epitopo sull'antigene LAG-3 che è distinto da quello per il primo anticorpo umano). I kit comprendono tipicamente un'etichetta  
10 per indicare l'uso prestabilito dei contenuti del kit. Il termine etichetta comprende qualsiasi materiale scritto o registrato che è fornito sul kit o con il kit, o che comunque accompagna il kit.

#### Terapia di combinazione

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in metodi di  
15 terapia di combinazione in cui l'anticorpo anti-LAG-3 viene co-somministrato insieme ad uno o più anticorpi addizionali che sono efficaci a stimolare delle risposte immunitarie, così da potenziare, stimolare o sovraregolare ulteriormente le risposte immunitarie in un soggetto. Ad esempio, l'invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per stimolare una risposta immunitaria in un soggetto, che prevede di somministrare al soggetto l'anticorpo anti-LAG-3 e uno o più anticorpi immunostimolanti addizionali, come un  
20 anticorpo anti-PD-1, un anticorpo anti-PD-L1 e/o un anticorpo anti-CTLA-4, in maniera tale da stimolare una risposta immunitaria nel soggetto, ad esempio per inibire la crescita di un tumore o per stimolare una risposta anti-virale. In una forma esecutiva, il soggetto riceve in somministrazione un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-PD-1. In un'altra forma esecutiva, il soggetto riceve in somministrazione un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-PD-L1. In ancora un'altra forma esecutiva, il soggetto riceve in somministrazione un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-CTLA-4. In una forma esecutiva, l'anticorpo anti-LAG-3 è un anticorpo umano, come un anticorpo della divulgazione. In  
25 alternativa, l'anticorpo anti-LAG-3 può essere, ad esempio, un anticorpo chimerico o umanizzato (ad esempio preparato



da un mAb anti-LAG-3 murino). In un'altra forma esecutiva, l'almeno un anticorpo immunostimolante addizionale (ad esempio un anticorpo anti-PD-1, anti-PD-L1 e/o anti-CTLA-4) è un anticorpo umano. In alternativa, l'almeno un anticorpo immunostimolante addizionale può essere, ad esempio, un anticorpo chimerico o umanizzato (ad esempio preparato da un anticorpo anti-PD-1, anti-PD-L1 e/o anti-CTLA-4 murino).

5 In una forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per trattare una malattia iperproliferativa (ad esempio un cancro), che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-CTLA-4 ad un soggetto. In ulteriori forme esecutive, l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrato ad una dose subterapeutica, l'anticorpo anti-CTLA-4 viene somministrato ad una dose subterapeutica, o entrambi vengono somministrati ad una dose subterapeutica. In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce  
10 un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per alterare un evento avverso associato al trattamento di una malattia iperproliferativa con un agente immunostimolante, che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e una dose subterapeutica di un anticorpo anti-CTLA-4 ad un soggetto. In certe forme esecutive, il soggetto è un essere umano. In certe forme esecutive, l'anticorpo anti-CTLA-4 è l'anticorpo monoclonale a sequenza umana 10D1 (descritto nella pubblicazione PCT WO 01/14424) e l'anticorpo anti-LAG-3 è un anticorpo monoclonale a sequenza umana, come  
15 l'anticorpo 25F7 qui descritto. Altri anticorpi anti-CTLA-4 circoscritti dai metodi della presente invenzione comprendono, ad esempio, quelli divulgati in: WO 98/42752; WO 00/37504; brevetto US 6.207.156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Riassunto n° 2505 (anticorpo CP-675206); e Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. In certe forme esecutive, l'anticorpo anti-CTLA-4 si lega alla CTLA-4 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega alla CTLA-4 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega alla CTLA-4 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, o si lega alla CTLA-4 umana con una  $K_D$  tra  $1 \times 10^{-8}$  M e  $1 \times 10^{-10}$  M o meno.  
20

In una forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per trattare una malattia iperproliferativa (ad esempio un cancro), che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1 ad un soggetto. In ulteriori forme esecutive, l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrato ad una dose subterapeutica, l'anticorpo anti-PD-1 viene somministrato ad una dose subterapeutica, o  
25



5 entrambi vengono somministrati ad una dose subterapeutica. In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per alterare un evento avverso associato al trattamento di una malattia iperproliferativa con un agente immunostimolante, che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e una dose subterapeutica di un anticorpo anti-PD-1 ad un soggetto. In certe forme esecutive, il soggetto è un essere umano. In certe forme esecutive, l'anticorpo anti-PD-1 è un anticorpo monoclonale a sequenza umana e l'anticorpo anti-LAG-3 è un anticorpo monoclonale a sequenza umana, come l'anticorpo 25F7 qui descritto. Esempi di anticorpi anti-PD-1 a sequenza umana comprendono 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 4A11, che sono descritti nella pubblicazione PCT WO 06/121168. In certe forme esecutive, l'anticorpo anti-PD-1 si lega alla PD-1 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega alla PD-1 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega alla PD-1 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, o si  
10 lega alla PD-1 umana con una  $K_D$  tra  $1 \times 10^{-8}$  M e  $1 \times 10^{-10}$  M o meno.

In una forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per trattare una malattia iperproliferativa (ad esempio un cancro), che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-L1 ad un soggetto. In ulteriori forme esecutive, l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrato ad una dose subterapeutica, l'anticorpo anti-PD-L1 viene somministrato ad una dose subterapeutica, o  
15 entrambi vengono somministrati ad una dose subterapeutica. In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per alterare un evento avverso associato al trattamento di una malattia iperproliferativa con un agente immunostimolante, che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e una dose subterapeutica di un anticorpo anti-PD-L1 ad un soggetto. In certe forme esecutive, il soggetto è un essere umano. In certe forme esecutive, l'anticorpo anti-PD-L1 è un anticorpo monoclonale a sequenza umana e l'anticorpo anti-LAG-3 è un anticorpo monoclonale a sequenza umana, come l'anticorpo 25F7 qui descritto. Esempi di anticorpi anti-PD-L1 a sequenza umana comprendono 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4, che sono descritti nella pubblicazione PCT WO 07/005874. In certe forme esecutive, l'anticorpo anti-PD-L1 si lega alla PD-L1 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega alla PD-L1 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-8}$  M o meno, si lega alla PD-L1 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-9}$  M o meno, o si lega alla PD-L1 umana con una  $K_D$  tra  $1 \times 10^{-8}$  M e  $1 \times 10^{-10}$  M o  
20 meno.  
25



5 Il blocco di LAG-3 e di uno o più secondi antigeni bersaglio, come CTLA-4 e/o PD-1 e/o PD-L1, può potenziare la risposta immunitaria contro le cellule cancerogene nel paziente. I cancri la cui crescita può essere inibita attraverso l'uso degli anticorpi della presente invenzione comprendono cancri che sono tipicamente responsivi ad un'immunoterapia. Esempi rappresentativi di cancri da trattare con la terapia di combinazione della presente divulgazione comprendono quei cancri specificatamente elencati sopra nella discussione della monoterapia con gli anticorpi anti-LAG-3.

10 In certe forme esecutive, la combinazione di anticorpi terapeutici qui discussa può essere somministrata simultaneamente come una composizione singola in un trasportatore farmaceuticamente accettabile, o può essere somministrata simultaneamente come composizioni separate di ciascun anticorpo in un trasportatore farmaceuticamente accettabile. In un'altra forma esecutiva, la combinazione di anticorpi terapeutici può essere somministrata sequenzialmente. Ad esempio, un anticorpo anti-CTLA-4 e un anticorpo anti-LAG-3 possono essere somministrati sequenzialmente, ad esempio, l'anticorpo anti-CTLA-4 viene somministrato per primo e l'anticorpo anti-LAG-3 per secondo, o l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrato per primo e l'anticorpo anti-CTLA-4 per secondo. In aggiunta o in alternativa, un anticorpo anti-PD-1 e un anticorpo anti-CTLA-4 possono essere somministrati sequenzialmente, ad esempio, l'anticorpo anti-PD-1 viene somministrato per primo e l'anticorpo anti-LAG-3 per secondo, o l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrato per primo e l'anticorpo anti-PD-1 per secondo. In aggiunta o in alternativa, un anticorpo anti-PD-L1 e un anticorpo anti-CTLA-4 possono essere somministrati sequenzialmente, ad esempio, l'anticorpo anti-PD-L1 viene somministrato per primo e l'anticorpo anti-LAG-3 per secondo, o l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrato per primo e l'anticorpo anti-PD-L1 per secondo.

20 Inoltre, in caso di somministrazione sequenziale di più di una dose della terapia di combinazione, è possibile invertire o mantenere invariato l'ordine della somministrazione sequenziale in ogni punto temporale della somministrazione, è possibile combinare delle somministrazioni sequenziali con delle somministrazioni simultanee, o una qualsiasi combinazione delle due cose. Ad esempio, la prima somministrazione di una combinazione anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-LAG-3 può essere simultanea, la seconda somministrazione può essere sequenziale con l'anti-CTLA-4 per primo e l'anti-LAG-3 per secondo, e la terza somministrazione può essere sequenziale con l'anti-LAG-3

25



per primo e l'anti-CTLA-4 per secondo, ecc. In aggiunta o in alternativa, la prima somministrazione di una  
combinazione anticorpo anti-PD-1 e anticorpo anti-LAG-3 può essere simultanea, la seconda somministrazione può  
essere sequenziale con l'anti-PD-1 per primo e l'anti-LAG-3 per secondo, e la terza somministrazione può essere  
sequenziale con l'anti-LAG-3 per primo e l'anti-PD-1 per secondo, ecc. In aggiunta o in alternativa, la prima  
5 somministrazione di una combinazione anticorpo anti-PD-L1 e anticorpo anti-LAG-3 può essere simultanea, la seconda  
somministrazione può essere sequenziale con l'anti-PD-L1 per primo e l'anti-LAG-3 per secondo, e la terza  
somministrazione può essere sequenziale con l'anti-LAG-3 per primo e l'anti-PD-L1 per secondo, ecc. Un altro schema  
di dosaggio rappresentativo può prevedere una prima somministrazione sequenziale con l'anti-LAG-3 per primo e l'anti-  
CTLA-4 (e/o l'anti-PD-1 e/o l'anti-PD-L1) per secondo, mentre le somministrazioni successive possono essere  
10 simultanee.

Opzionalmente, la combinazione comprendente un anti-LAG-3 e uno o più anticorpi addizionali (ad esempio  
anticorpi anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1) può essere ulteriormente combinata con un agente immunogenico,  
come cellule cancerogene, antigeni tumorali purificati (tra cui proteine ricombinanti, peptidi e molecole carboidriche),  
cellule, e cellule trasfettate con geni codificanti per citochine immunostimolanti (He et al. (2004) J. Immunol.  
15 173:4919-28). Esempi non limitativi di vaccini tumorali che possono essere usati comprendono peptidi di antigeni di  
melanoma, come peptidi di gp100, antigeni di MAGE, Trp-2, MART1 e/o tirosinasi, o cellule tumorali trasfettate per  
esprimere la citochina GM-CSF (discusso ulteriormente sotto). Un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1  
e/o di PD-L1 può essere ulteriormente combinato con un protocollo di vaccinazione, come uno qualsiasi dei protocolli  
di vaccinazione discussi sopra in dettaglio con riferimento alla monoterapia con gli anticorpi anti-LAG-3.

Un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1 può essere anche ulteriormente combinato  
20 con trattamenti anti-cancro standard. Ad esempio, un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1  
può essere efficacemente combinato con regimi chemioterapici. In questi casi, adoperando la combinazione della  
presente divulgazione, è possibile ridurre la dose dell'altro reagente chemioterapico somministrato (Mokyr et al. (1998)  
Cancer Research 58: 5301-5304). Un esempio di tale combinazione è una combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-  
25 CTLA-4 e/o di anticorpi anti-PD-1 e/o di anticorpi anti-PD-L1 in ulteriore combinazione con la dacarbazina per il



trattamento di un melanoma. Un altro esempio è una combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o di anticorpi anti-PD-1 e/o di anticorpi anti-PD-L1 in ulteriore combinazione con l'interleuchina-2 (IL-2) per il trattamento di un melanoma. La giustificazione scientifica dietro l'uso combinato di un blocco di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1 con la chemioterapia è che la morte delle cellule, una conseguenza dell'azione citotossica della maggior parte dei composti chemioterapici, genererà livelli aumentati di antigene tumorale nella via di presentazione dell'antigene. Altre terapie di combinazione che possono produrre una sinergia con un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1 attraverso la morte delle cellule comprendono la radiazione, la chirurgia e la deprivazione ormonale. Ciascuno di questi protocolli crea una fonte di antigene tumorale nell'ospite. Anche gli inibitori dell'angiogenesi possono essere combinati con un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1. L'inibizione dell'angiogenesi causa la morte delle cellule tumorali, dando luogo ad una fonte potenziale di antigene tumorale che viene alimentata nelle vie di presentazione dell'antigene dell'ospite.

Una combinazione di anticorpi bloccanti anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 può anche essere adoperata in combinazione con anticorpi bispecifici capaci di localizzare le cellule effettrici che esprimono i recettori per Fc $\alpha$  o Fc $\gamma$  sulle cellule tumorali (vedere ad esempio i brevetti US 5.922.845 e US 5.837.243). Gli anticorpi bispecifici possono essere usati per prendere a bersaglio due antigeni separati. Il braccio a cellule T di queste risposte verrà potenziato dall'uso di un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1.

In un altro esempio, una combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o di anticorpi anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 può essere usata in associazione con anticorpi anti-neoplastici come Rituxan<sup>®</sup> (rituximab), Herceptin<sup>®</sup> (trastuzumab), Bexxar<sup>®</sup> (tositumomab), Zevalin<sup>®</sup> (ibritumomab), Campath<sup>®</sup> (alemtuzumab), Lymphocide<sup>®</sup> (epratuzumab), Avastin<sup>®</sup> (bevacizumab), Tarceva<sup>®</sup> (erlotinib) e simili. A titolo esemplificativo e senza volersi legare alla teoria, è possibile che il trattamento con un anticorpo anti-cancro, o con un anticorpo anti-cancro coniugato ad una tossina, provochi la morte delle cellule cancerogene (ad esempio delle cellule tumorali), potenziando così una risposta immunitaria mediata da CTLA-4, PD-1, PD-L1 o LAG-3. In una forma esecutiva esemplificativa, un trattamento di una malattia iperproliferativa (ad esempio di un tumore cancerogeno) può comprendere un anticorpo anti-cancro in combinazione con anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1, somministrati in maniera



simultanea, in maniera sequenziale o in qualsiasi loro combinazione, che possono potenziare una risposta immunitaria anti-tumore esercitata dall'ospite.

5 I tumori eludono la sorveglianza immunitaria dell'ospite tramite una grande varietà di meccanismi. Molti di questi meccanismi possono essere superati attraverso l'inattivazione di proteine che vengono espresse dai tumori e che sono immunosoppressive. Queste comprendono, tra le altre, TGF- $\beta$  (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200) e il ligando Fas (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). In un altro esempio, degli anticorpi diretti contro ciascuna di queste entità possono essere ulteriormente combinati con una combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 allo scopo di neutralizzare gli effetti degli agenti immunosoppressivi e di favorire le risposte immunitarie esercitate dall'ospite contro  
10 il tumore.

Una combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 può anche essere adoperata in combinazione con altri anticorpi che possono essere utilizzati per attivare la responsività immunitaria dell'ospite. Questi comprendono molecole, presenti sulla superficie delle cellule dendritiche, che attivano la funzione delle DC e la presentazione dell'antigene. Gli anticorpi anti-CD40 (Ridge et al., sopra) possono essere adoperati in  
15 combinazione con una combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 (Ito et al, sopra). Anche altri anticorpi attivanti diretti contro molecole costimolatorie delle cellule T (Weinberg et al., sopra, Melero et al. sopra, Hutloff et al., sopra) possono fornire livelli aumentati di attivazione delle cellule T.

Come discusso sopra, il trapianto di midollo osseo viene attualmente utilizzato per il trattamento di una varietà di tumori di origine emopoietica. Un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o do PD-L1 può essere usato  
20 per aumentare l'efficacia delle cellule T tumore-specifiche innestate dal donatore.

Diversi protocolli di trattamento sperimentale prevedono l'attivazione e l'espansione ex vivo di cellule T antigene-specifiche e il trasferimento adottivo di queste cellule in riceventi allo scopo di stimolare cellule T antigene-specifiche contro un tumore (Greenberg & Riddell, sopra). Questi metodi possono essere anche utilizzati per attivare delle risposte a cellule T nei confronti di agenti infettivi, come CMV. È possibile prevedere che l'attivazione ex vivo



ottenuta in presenza degli anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 aumenti la frequenza e l'attività delle cellule T che vengono sottoposte a trasferimento adottivo.

In certe forme esecutive, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-CTLA-4 dell'invenzione da usare in un metodo per alterare un evento avverso associato al trattamento di una malattia iperproliferativa (ad esempio un cancro) con un agente immunostimolante, che prevede di somministrare l'anticorpo anti-LAG-3 e una dose subterapeutica di un anticorpo anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 ad un soggetto. Ad esempio, attraverso la somministrazione di uno steroide non assorbibile al paziente, è possibile ridurre l'incidenza della colite o della diarrea indotta dagli anticorpi terapeutici immunostimolanti. Poiché ogni paziente che riceverà un anticorpo terapeutico immunostimolante è a rischio di sviluppare una colite o una diarrea indotta da tale anticorpo, questa intera popolazione di pazienti è adatta per la terapia secondo i metodi della presente invenzione. Benché gli steroidi siano stati somministrati per trattare la malattia infiammatoria delle viscere (IBD) e prevenire le riacutizzazioni della IBD, essi non sono stati utilizzati per prevenire (ridurre l'incidenza di) la IBD nei pazienti senza diagnosi di IBD. I significativi effetti collaterali associati agli steroidi, anche agli steroidi non assorbibili, ne hanno scoraggiato un uso profilattico.

In ulteriori forme esecutive, un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1 (ovvero l'uso combinato degli anticorpi terapeutici immunostimolanti anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o degli anticorpi anti-PD-1 e/o degli anticorpi anti-PD-L1) può essere ulteriormente combinato con l'uso di un qualsiasi steroide non assorbibile. Nel presente contesto, uno "steroido non assorbibile" è un glucocorticoide che mostra un estensivo metabolismo di primo passaggio tale per cui, dopo il metabolismo nel fegato, la biodisponibilità dello steroide è bassa, ovvero minore di circa 20%. In una forma esecutiva dell'invenzione, lo steroide non assorbibile è budesonide. Il budesonide è un glucocorticoide ad azione locale che viene estensivamente metabolizzato, principalmente dal fegato, dopo la sua somministrazione orale. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) è una formulazione orale di budesonide pH- e tempo-dipendente che è stata sviluppata per ottimizzare la distribuzione del farmaco nell'ileo e in tutto il colon. ENTOCORT EC® è approvato negli Stati Uniti per il trattamento del morbo di Crohn di grado da lieve a moderato che colpisce l'ileo e/o il colon ascendente. Il dosaggio orale abituale di ENTOCORT EC® per il trattamento del morbo di Crohn è 6 - 9 mg/giorno. ENTOCORT EC® viene rilasciato nell'intestino prima di essere assorbito e trattenuto nella mucosa



5 intestinale. Una volta passato attraverso il tessuto bersaglio della mucosa intestinale, ENTOCORT EC® viene estensivamente metabolizzato in metaboliti con un'attività di glucocorticoide trascurabile dal sistema del citocromo P450 nel fegato. Pertanto, la sua biodisponibilità è bassa (circa 10%). La bassa biodisponibilità del budesonide determina un migliore indice terapeutico rispetto ad altri glucocorticoidi con un metabolismo di primo passaggio meno estensivo. Il budesonide causa meno effetti avversi, tra cui una minore soppressione dell'ipotalamo-ipofisi rispetto ai corticosteroidi ad azione sistemica. Tuttavia, la somministrazione cronica di ENTOCORT EC® può provocare effetti sistemici da glucocorticoidi, come ipercorticismo e soppressione surrenalica. Vedere PDR, 58ª ed. 2004; 608-610.

10 In ancora altre forme esecutive, un blocco combinato di LAG-3 e CTLA-4 e/o di PD-1 e/o di PD-L1 (ovvero l'uso combinato degli anticorpi terapeutici immunostimolanti anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o degli anticorpi anti-PD-1 e/o anti-PD-L1) in combinazione con uno steroide non assorbibile può essere ulteriormente combinato con un salicilato. I salicilati comprendono agenti a base di 5-ASA, come ad esempio: sulfasalazina (AZULFLDINE®, Pharmacia & UpJohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazide (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); e mesalammina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

15 Secondo gli usi medici della presente invenzione, la somministrazione di un salicilato in combinazione con anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1 e con uno steroide non assorbibile può prevedere qualsiasi somministrazione sovrapposta o sequenziale del salicilato e dello steroide non assorbibile allo scopo di ridurre l'incidenza della colite indotta dagli anticorpi immunostimolanti. Così, ad esempio, i metodi per ridurre l'incidenza della colite indotta dagli anticorpi immunostimolanti secondo la presente invenzione prevedono di somministrare un salicilato e uno steroide non assorbibile in maniera simultanea o sequenziale (ad esempio, un salicilato viene somministrato 6 ore dopo uno steroide non assorbibile) o in qualsiasi loro combinazione. Inoltre, secondo la presente invenzione, un salicilato e uno steroide non assorbibile possono essere somministrati attraverso la stessa via (ad esempio, entrambi vengono somministrati per via orale) o attraverso vie differenti (ad esempio, un salicilato viene somministrato per via orale e uno steroide non assorbibile viene somministrato per via rettale), dette vie potendo essere diverse dalla/dalle vie  
20  
25 usate per somministrare gli anticorpi anti-LAG-3 e anti-CTLA-4 e/o anti-PD-1 e/o anti-PD-L1.



La presente divulgazione viene ulteriormente illustrata per mezzo dei seguenti esempi, i quali non vanno tuttavia interpretati come un ulteriore limite.

Esempio 1: Generazione di anticorpi monoclonali umani contro LAG-3

5 Gli anticorpi monoclonali umani anti-LAG-3 sono stati generati utilizzando topi transgenici che esprimono geni anticorpali umani nel seguente modo.

Antigeni

10 Come immunogeno per sviluppare gli anticorpi anti-LAG-3 umana, sono state adoperate delle proteine di fusione ricombinanti contenenti la LAG-3 umana. Come immunogeno in certe immunizzazioni, è stata adoperata una proteina di fusione comprendente l'intera regione extracellulare (domini 1-4) della LAG-3 umana fusa ad un dominio Fc di immunoglobulina umana (R&D Systems, n° catalogo 2319-L3) (D1-D4-hFc) o ad un dominio Fc di immunoglobulina murina (D1-D4-mFc). Come immunogeno per altre immunizzazioni, è stata adoperata una proteina di fusione comprendente solo i primi due domini extracellulari della LAG-3 umana fusi ad un dominio Fc di immunoglobulina murina (D1-D2-mFc). Le proteine di fusione contenenti LAG-3 sono state preparate utilizzando tecniche standard di DNA ricombinante.

15 Ceppi transgenici transcromosomici KM Mouse<sup>TM</sup> e KM/FCGR2D Mouse<sup>TM</sup>

Gli anticorpi monoclonali completamente umani contro la LAG-3 umana sono stati preparati utilizzando topi dei ceppi transgenici transcromosomici KM Mouse<sup>TM</sup> e KM/FCGR2D Mouse<sup>TM</sup>, i quali esprimono geni anticorpali umani.

20 Nel ceppo KM Mouse<sup>TM</sup>, il gene endogeno murino per la catena leggera kappa è stato sottoposto a distruzione omozigote come descritto in Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820, e il gene endogeno murino della catena pesante è stato sottoposto a distruzione omozigote come descritto nell'Esempio 1 della pubblicazione PCT WO 01/09187. Inoltre, questo ceppo murino reca un transgene umano di catena leggera kappa, KCo5, come descritto in Fishwild et al., sopra. Il ceppo contiene anche il transcromosoma SC20, che reca il locus per la catena pesante delle Ig umane, come descritto nella pubblicazione PCT WO 02/43478. Il ceppo KM/FCGR2D Mouse<sup>TM</sup> è identico al ceppo KM Mouse<sup>TM</sup>, tranne per  
25 il fatto che il suo genoma comprende anche una distruzione omozigote del gene FcγRIIB endogeno. I ceppi KM



Mouse<sup>TM</sup> e KM/FCGR2D Mouse<sup>TM</sup> sono anche descritti nel dettaglio nella pubblicazione di domanda US 20020199213.

Immunizzazione di KM Mouse<sup>TM</sup> e KM/FCGR2D Mouse<sup>TM</sup>:

5 Per generare gli anticorpi monoclonali completamente umani contro LAG-3, i topi dei ceppi KM Mouse<sup>TM</sup> e KM/FCGR2D Mouse<sup>TM</sup> sono stati immunizzati con una delle tre differenti proteine di fusione ricombinanti contenenti LAG-3 descritte sopra (D1-D4-hFc, D1-D4-mFc, D1-D2-mFc). Gli schemi generali di immunizzazione sono descritti in Lonberg et al. (1994) sopra; Fishwild et al., sopra, e pubblicazione PCT WO 98/24884. Al momento della prima infusione dell'antigene, i topi avevano un'età di 6-16 settimane. I topi sono stati immunizzati per via intraperitoneale (IP) e/o per via sottocutanea (SC). I topi sono stati immunizzati prima quattro volte, su base bisettimanale, con 10 µg della proteina di fusione ricombinante contenente LAG-3, e poi due volte con 20 µg dello stesso immunogeno in Ribi  
10 come adiuvante. La risposta immunitaria veniva monitorata attraverso prelievi retroorbitali. Il plasma è stato sottoposto a screening via ELISA (come descritto sotto), e i topi con titoli sufficienti di immunoglobulina umana anti-LAG-3 sono stati utilizzati per le fusioni. Prima del sacrificio e della rimozione delle milze, i topi sono stati richiamati per via endovenosa e per via intraperitoneale con 20 µg dell'antigene, e sono stati poi richiamati per via endovenosa con 20 µg  
15 dell'antigene.

Selezione dei topi KM e KM/FCGR2D che producono gli anticorpi anti-LAG-3

Per selezionare i topi che producevano anticorpi capaci di legare la proteina LAG-3, i sieri dei topi immunizzati con la proteina di fusione D1-D4 hFc sono stati esaminati attraverso un ELISA modificato come originariamente descritto da Fishwild et al. (1996). In breve, delle piastre di microtitolazione sono state rivestite con la  
20 proteina di fusione ricombinate contenente IFNAR-1 purificata a 1 µg/ml in PBS, 50 µl/pozzetto, sono state incubate a 4°C per una notte, e sono state poi bloccate con 200 µl/pozzetto di BSA 5% in PBS. Le diluizioni di plasma dei topi immunizzati con LAG-3 sono state aggiunte a ciascun pozzetto e incubate per 1-2 ore a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate con PBS/Tween e poi incubate con un anticorpo policlonale anti-catena leggera kappa umana di capra, coniugato con perossidasi di rafano (HRP), per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio, le piastre sono  
25 state sviluppate con il substrato ABTS e analizzate allo spettrofotometro ad una OD di 405.



Per i topi immunizzati con le proteine di fusione D1-D4-mFc o D1-D2-mFc, i sieri di questi topi sono stati esaminati attraverso un ELISA indiretto utilizzando un anti-IgG murina di capra allo scopo di rivestire le piastre per un'ora prima del rivestimento con l'antigene, così da eliminare il legame aspecifico alla parte Fc di topo. Sono stati poi condotti gli stessi passaggi ELISA descritti sopra.

5 I topi che sono stati utilizzati per le fusioni erano quelli che avevano sviluppato i titoli più alti di anticorpi anti-LAG-3. Le fusioni sono state condotte come descritto sotto, e l'attività anti-LAG-3 dei sovranatanti di ibridoma è stata esaminata via ELISA.

Generazione di ibridomi che producono anticorpi monoclonali umani contro le proteine LAG-3

10 Gli splenociti di topo, isolati dai topi KM o KM/FCGR2D, sono state fuse ad una linea cellulare di mieloma murino per elettro fusione in campo elettrico utilizzando un elettroporatore per fusioni cellulari a camera larga Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Gli ibridomi risultanti sono stati poi sottoposti a screening per la produzione di anticorpi antigene-specifici. Le sospensioni a singola cellula dei linfociti splenici dei topi immunizzati sono state fuse ad un quarto del numero di cellule di mieloma murino non secernente P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580). Le cellule sono state seminate a circa  $1 \times 10^5$ /pozzetto in una piastra di microtitolazione a fondo piatto, e sono  
15 state poi incubate per circa due settimane in un terreno selettivo contenente siero fetale di vitello 10% integrato con origen (IGEN) in RPMI, L-glutammina, piruvato di sodio, HEPES, penicillina, streptomina, gentamicina, HAT 1x e  $\beta$ -mercaptoetanololo. Dopo 1-2 settimane, le cellule sono state coltivate nel terreno in cui HAT era stato sostituito con HT. I singoli pozzetti sono stati poi sottoposti a screening via ELISA (come descritto sopra) per gli anticorpi monoclonali ad IgG umani anti-LAG-3. Il terreno veniva generalmente monitorato dopo 10-14 giorni, una volta  
20 ottenuta una crescita estensiva degli ibridomi. Gli ibridomi che secernevano gli anticorpi sono stati ripiastrati, nuovamente sottoposti a screening e se, ancora positivi alle IgG umane, gli anticorpi monoclonali anti-LAG-3 sono stati subclonati almeno due volte mediante diluizione limite. I subcloni stabili sono stati poi coltivati in vitro per generare piccole quantità di anticorpo nel terreno di coltura tissutale in vista di un'ulteriore caratterizzazione.

25 I cloni di ibridoma 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono stati selezionati per un'ulteriore analisi e per il sequenziamento.



Esempio 2: Caratterizzazione funzionale degli anticorpi monoclonali anti-LAG-3 umani 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5

Le sequenze di cDNA codificanti per le regioni variabili di catena pesante e leggera dei mAb espressi dai cloni 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 descritti nell'Esempio 1 sono state sequenziate utilizzando il seguente  
5 protocollo. L'RNA totale di  $5 \times 10^6$  cellule di ibridoma è stato preparato utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA). Il cDNA è stato preparato attraverso il protocollo 5'-RACE con il kit di amplificazione del cDNA SMART RACE (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) e la retrotrascrittasi SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Le regioni V di ogni anticorpo sono state amplificate adoperando un primer per regione costante umana-specifica 3' in combinazione con la miscela di primer universali per 5' RACE. I prodotti della PCR contenenti la regione  
10 V sono stati clonati nel vettore pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), e trasformati nel ceppo di *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sono stati preparati dei campioni miniprep DNA o Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA), e tali campioni sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA (Sequetech, Mountain View, CA). Le sequenze di DNA risultanti sono state analizzate per i riarrangiamenti in cornice e altre caratteristiche degli anticorpi. Le proteine espresse sono state caratterizzate mediante analisi standard della chimica delle proteine. È stato  
15 scoperto che i cloni 125E3, 25F7 e 26H10 esprimevano un anticorpo comprendente una catena pesante di IgG1 e una catena leggera kappa, è stato scoperto che i cloni 8B7 e 17E5 esprimevano un anticorpo comprendente una catena pesante di IgG4 e una catena leggera kappa, ed è stato scoperto che il clone 11F2 esprimeva un anticorpo comprendente una catena pesante di IgG2 e una catena leggera kappa.

La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena pesante di 25F7 sono  
20 mostrate nella Figura 1A e in SEQ ID NO:49 e 37, rispettivamente. La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena leggera kappa di 25F7 sono mostrate nella Figura 1B e in SEQ ID NO:55 e 43, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena pesante di 25F7 e note sequenze di catena pesante di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 7) ha mostrato che la catena pesante di 25F7 utilizza un segmento  $V_H$  della linea germinale umana  $V_H$  4-34 (SEQ ID NO:61) e un segmento JH della linea germinale umana  
25 JH5b (SEQ ID NO:62). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_H$  di 25F7 utilizzando il sistema di Kabat per la



determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nella Figura 1A e in SEQ ID NO:1, 7 e 13, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena leggera di 25F7 e note sequenze di catena leggera di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 8) ha mostrato che la catena leggera kappa di 25F7 utilizza un segmento V<sub>K</sub> della linea germinale umana V<sub>K</sub> L6 (SEQ ID NO:63) e un segmento J<sub>K</sub> della linea germinale umana JK 2 (SEQ ID NO:64).  
5 Un'ulteriore analisi della sequenza di V<sub>K</sub> di 25F7 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella Figura 1B e in SEQ ID NO:19, 25 e 31, rispettivamente.

La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena pesante di 26H10 sono mostrate nella Figura 2A e in SEQ ID NO:50 e 38, rispettivamente. La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 26H10 sono mostrate nella Figura 2B e in SEQ ID NO:56 e 44, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena pesante di 26H10 e note sequenze di catena pesante di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 9) ha mostrato che la catena pesante di 26H10 utilizza un segmento V<sub>H</sub> della linea germinale umana V<sub>H</sub> 3-33 (SEQ ID NO:65) e un segmento J<sub>H</sub> della linea germinale umana JH 6B (SEQ ID NO:66).  
10 Un'ulteriore analisi della sequenza di V<sub>H</sub> di 26H10 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nella Figura 2A e in SEQ ID NO:2, 8 e 14, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena leggera di 26H10 e note sequenze di catena leggera di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 10) ha mostrato che la catena leggera kappa di 26H10 utilizza un segmento V<sub>K</sub> della linea germinale umana V<sub>K</sub> A27 (SEQ ID NO:67) e un segmento J<sub>K</sub> della linea germinale umana JK 3 (SEQ ID NO:68).  
15 Un'ulteriore analisi della sequenza di V<sub>K</sub> di 26H10 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella Figura 2B e in SEQ ID NO:20, 26 e 32, rispettivamente.

La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena pesante di 25E3 sono mostrate nella Figura 3A e in SEQ ID NO:51 e 39, rispettivamente. La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi  
20  
25



della regione variabile di catena leggera di 25E3 sono mostrate nella Figura 3B e in SEQ ID NO:57 e 45, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena pesante di 25E3 e note sequenze di catena pesante di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 11) ha mostrato che la catena pesante di 25E3 utilizza un segmento  $V_H$  della linea germinale umana  $V_H$  3-20 (SEQ ID NO:69) e un segmento JH della linea germinale umana JH 4b (SEQ ID NO:70). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_H$  di 25e3 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nella Figura 3A e in SEQ ID NO:3, 9 e GGY, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena leggera di 25E3 e note sequenze di catena leggera di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 12) ha mostrato che la catena leggera kappa di 25E3 utilizza un segmento  $V_k$  della linea germinale umana  $V_k$  L18 (SEQ ID NO:71) e un segmento  $J_k$  della linea germinale umana JK 2 (SEQ NO:64). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_k$  di 25E3 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella Figura 3B e in SEQ ID NO:21, 27 e 33, rispettivamente.

La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena pesante di 8B7 sono mostrate nella Figura 4A e in SEQ ID NO:52 e 40, rispettivamente. La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 8B7 sono mostrate nella Figura 4B e in SEQ ID NO:58 e 46, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena pesante di 8B7 e note sequenze di catena pesante di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 13) ha mostrato che la catena pesante di 8B7 utilizza un segmento  $V_H$  della linea germinale umana  $V_H$  4-34 (SEQ ID NO:61) e un segmento JH della linea germinale umana JH 5B (SEQ ID NO:62). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_H$  di 8B7 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nella Figura 4A e in SEQ ID NO:4, 10 e 16, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena leggera di 8B7 (Figura 14) e note sequenze di catena leggera di immunoglobuline della linea germinale umana ha mostrato che la catena leggera kappa di 8B7 utilizza un segmento  $V_k$  della linea germinale umana  $V_k$  L6 (SEQ ID NO:63) e un segmento  $J_k$  della linea germinale umana JK 4 (SEQ ID NO:72). Un'ulteriore



analisi della sequenza di  $V_k$  di 26H10 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella Figura 4B e in SEQ ID NO:22, 28 e 34, rispettivamente.

5 La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena pesante di 11F2 sono mostrate nella Figura 5A e in SEQ ID NO:53 e 41, rispettivamente. La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 11F2 sono mostrate nella Figura 5B e in SEQ ID NO:59 e 47, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena pesante di 11F2 e note sequenze di catena pesante di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 15) ha mostrato che la catena pesante di 11F2 utilizza un segmento  $V_H$  della linea germinale umana  $V_H$  1-24 (SEQ ID NO:73), un segmento D della linea germinale umana 2-10 15, e un segmento JH della linea germinale umana JH 4B (SEQ ID NO:70). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_H$  di 11F2 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nella Figura 13A e in SEQ ID NO:5, 11 e 17, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena leggera di 11F2 e note sequenze di catena leggera di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 16) ha mostrato che la catena leggera kappa di 11F2 15 utilizza un segmento  $V_k$  della linea germinale umana  $V_k$  L6 (SEQ ID NO:63) e un segmento  $J_k$  della linea germinale umana JK 1 (SEQ ID NO:74). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_k$  di 11F2 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella Figura 5B e in SEQ ID NO:23, 29 e 35, rispettivamente.

20 La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena pesante di 17E5 sono mostrate nella Figura 6A e in SEQ ID NO:54 e 42, rispettivamente. La sequenza di nucleotidi e quella di amminoacidi della regione variabile di catena leggera di 17E5 sono mostrate nella Figura 6B e in SEQ ID NO:60 e 48, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena pesante di 17E5 e note sequenze di catena pesante di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 17) ha mostrato che la catena pesante di 17E5 utilizza un segmento  $V_H$  della linea germinale umana  $V_H$  3-33 (SEQ ID NO:65), un segmento D della linea germinale umana 2-25 2, e un segmento JH della linea germinale umana JH 4B (SEQ ID NO:70). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_H$  di



17E5 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nella Figura 6A e in SEQ ID NO:6, 12 e 18, rispettivamente. Un confronto tra la sequenza dell'immunoglobulina di catena leggera di 17E5 e note sequenze di catena leggera di immunoglobuline della linea germinale umana (Figura 18) ha mostrato che la catena leggera kappa di 17E5 utilizza un segmento  $V_k$  della linea germinale umana  $V_k$  L6 (SEQ ID NO:63) e un segmento  $J_k$  della linea germinale umana JK 5 (SEQ ID NO:75). Un'ulteriore analisi della sequenza di  $V_k$  di 17E5 utilizzando il sistema di Kabat per la determinazione delle regioni di CDR ha portato a delineare le regioni di CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella Figura 6B e in SEQ ID NO:24, 30 e 36, rispettivamente.

Le regioni variabili di 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 possono essere convertite in anticorpi di lunghezza integrale di qualsiasi isotipo adoperando tecniche standard di DNA ricombinante. Ad esempio, il DNA codificante per le regioni di  $V_H$  e  $V_L$  può essere clonato in un vettore di espressione che reca le regioni costanti di catena pesante e leggera in maniera tale da collegare operativamente le regioni variabili alle regioni costanti. In alternativa, è possibile utilizzare vettori separati per l'espressione della catena pesante di lunghezza integrale e della catena leggera di lunghezza integrale. Esempi non limitativi di vettori di espressione adatti per l'uso nella creazione di anticorpi di lunghezza integrale comprendono i vettori pIE descritti nella pubblicazione di brevetto US 20050153394.

Esempio 3: Caratterizzazione delle proprietà di legame degli anticorpi monoclonali anti-LAG-3

In questo esempio, il legame degli anticorpi anti-LAG-3 umani ad una LAG-3 di superficie cellulare (LAG-3 di essere umano, scimmia e topo) è stato esaminato in citometria di flusso. Inoltre, le cinetiche di legame alle LAG-3 sono state analizzate mediante analisi in Biacore. Adoperando un esperimento di scansione peptidica, è stata condotta ancora un'ulteriore mappatura epitopica.

#### A. Studi in citometria di flusso

##### 1. Legame alla LAG-3 umana sulle cellule CHO

Per esaminare la capacità degli anticorpi di legarsi ad una proteina LAG-3 di superficie cellulare, gli anticorpi sono stati incubati con una linea di cellule CHO che era stata trasfettata per esprimere la LAG-3 umana sulla superficie delle cellule. Gli anticorpi monoclonali 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 sono stati sottoposti a diluizione seriale



con tampone PFAE freddo 1x (PBS 1x + FBS 2%, azoturo di sodio 0,02%, Na EDTA 2 mM). Per la reazione di legame, 50  $\mu$ l della soluzione dell'anticorpo diluito sono stati aggiunti a 50  $\mu$ l di una sospensione cellulare contenente  $2 \times 10^5$  cellule, e la miscela è stata incubata su ghiaccio per 30 minuti. Le cellule sono state poi lavate due volte con tampone PFAE 1x. È stata aggiunta una diluizione 1:100 di un anticorpo anti-catena leggera kappa umana di capra marcato con FITC (Bethyl Laboratories, Inc., n° cat. A80-115F), e la miscela è stata incubata per 30 minuti a 4°C prima di essere lavata due volte con tampone PFAE freddo 1x. Dopo il lavaggio finale, ogni soluzione è stata addizionata con 150  $\mu$ l di PFAE freddo 1x contenente propidio ioduro 10  $\mu$ g/mL (Roche Applied Science, n° cat. 1\_348\_639), e l'analisi del legame dell'anticorpo è stata condotta in citometria di flusso adoperando un citometro di flusso FACScalibur (BD Biosciences).

I risultati dell'analisi in citometria di flusso sono riepilogati nella Tabella 1 che mostra le  $EC_{50}$  per il legame alla LAG-3 umana sulle CHO, dimostrando che 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 e 17E5 si legano efficacemente alla LAG-3 umana di superficie cellulare, con 25F7 che ha una  $EC_{50}$  circa 20 volte inferiore rispetto a quella di 25E3 ma una  $EC_{50}$  approssimativamente equivalente a quella di 8B7 e 26H10. I risultati di  $EC_{50}$  per 11F2 e 17E5 si trovavano nello stesso campo di quello per 25E3.

Tabella 1: Legame degli anticorpi anti-LAG-3 a cellule CHO che esprimono la LAG-3 umana

Anticorpo	$EC_{50}$ (nM)
25F7	0,45 - 2,52
8B7	1,93 - 4,44
26H10	1,81 - 3,64
11F2	15,12
25E3	14,9 - 25,39
17E5	12,3

## 2. Legame alle cellule T CD4<sup>+</sup> umane attivate



Per esaminare la capacità degli anticorpi di legarsi alla LAG-3 umana nativa sulla superficie delle cellule T umane attivate, delle cellule T CD4<sup>+</sup> quiescenti sono state isolate da cellule mononucleate di sangue periferico purificate, e sono state sottoposte a tre giorni di stimolazione con una combinazione di anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 attaccati a sferette di polistirene. Gli anticorpi monoclonali 25F7, 8B7 e 26H10 sono stati sottoposti a diluizione seriale con tampone PFAE freddo 1x (PBS 1x + FBS 2%, azoturo di sodio 0,02%, Na EDTA 2 mM). Per la reazione di legame, 50 µl della soluzione dell'anticorpo diluito sono stati miscelati con 50 µl di un anti-CD4 umano marcato con PE (BD Biosciences, n° cat. 555347). Le cellule T attivate sono state trattate attraverso lo stesso protocollo descritto sopra. L'analisi del legame dell'anticorpo è stata condotta come descritto sopra.

I risultati dell'analisi in citometria di flusso sono riepilogati nella Tabella 2 che mostra le EC<sub>50</sub> per il legame alle cellule T CD4<sup>+</sup> umane attivate, dimostrando che tutti e tre gli anticorpi si legano alla LAG-3 umana di superficie cellulare in maniera simile.

Tabella 2: Legame degli anticorpi anti-LAG-3 alle cellule T CD4<sup>+</sup> umane attivate

Anticorpo	EC <sub>50</sub> (nM)
25F7	0,27 - 0,45
26H10	0,41 - 0,84
8B7	0,69 - 1,80

### 3. Legame ad un antigene LAG-3 di scimmia

Per determinare se gli anticorpi anti-LAG-3 cross-reagissero con una LAG-3 di scimmia, è stata condotta una clonazione via RT-PCR di una sequenza di cDNA di una preparazione di cDNA raggruppati generata mediante retrotrascrizione degli RNA di una collezione di campioni di tessuto di scimmie cynomolgus e rhesus. La sequenza è stata innanzitutto amplificata dal pool di cDNA adoperando i primer (primer diretto 5': 5Mcyn1408; 5'-atgtggaggctcagttcctg-3' (SEQ ID NO:91) & primer inverso 3': 3Mcyn1408a; 5'-gtcagagctgctccggcto-3' (SEQ ID NO:92)) e utilizzando un sistema di amplificazione via PCR GC-Rich (Roche), ed è stata poi clonata in un vettore di clonazione TOPO ricevente (Invitrogen) per l'analisi della sequenza. I cloni corrispondenti alla sequenza di LAG-3 di



scimmia rhesus di riferimento in Genbank (n° d'ingresso Genbank XM\_001108923) sono stati successivamente ri-amplificati dal DNA del vettore di clonazione TOPO adoperando una seconda serie di primer che incorporavano siti per enzimi di restrizione allo scopo di permettere una clonazione direzionale in un vettore di espressione per cellule di mammifero.

5 Il clone di LAG-3 di scimmia pa23-5 è stato isolato e sequenziato. La sequenza isolata di scimmia mostrava un'identità di 99,6% con la sequenza di LAG-3 di scimmia rhesus di riferimento in Genbank. La Figura 19 mostra un confronto tra la sequenza di amminoacidi del clone a cDNA pa23-3 (SEQ ID NO:93) e la LAG-3 di scimmia rhesus (SEQ ID NO:94) di GenBank (n° d'ingresso XM\_001108923). Le due sequenze sono identiche ad eccezione di una differenza di un singolo amminoacido nella posizione 419 (un'arginina nel clone pa23-5 contro una treonina nella  
10 sequenza di rhesus in Genbank) e, su questa base, si conclude che il clone a cDNA pa23-5 rappresenta la sequenza del gene LAG-3 di rhesus.

Il cDNA del clone pa23-5 è stato inserito in un costrutto di espressione, il quale è stato trasfettato in cellule CHO-S in sospensione mediante nucleofezione (Amaxa). L'espressione della LAG-3 di rhesus da parte dei cloni sopravvissuti ad una selezione mediante farmacoresistenza è stata verificata tramite analisi FACS. Questa linea cellulare  
15 CHO clonale, che sovraesprime la LAG-3 di rhesus, è stata utilizzata in saggi FACS simili a quelli descritti sopra per misurare la cross-reattività degli anticorpi con la proteina di scimmia. In breve, gli anticorpi monoclonali 25F7, 8B7 e 26H10 sono stati sottoposti a diluizione seriale con tampone PFAE freddo 1x (PBS 1x + FBS 2%, azoturo di sodio 0,02%, Na EDTA 2 mM). Per la reazione di legame, 50 µl della soluzione dell'anticorpo diluito sono stati aggiunti a 50 µl di una sospensione cellulare contenente  $2 \times 10^5$  cellule, e la miscela è stata incubata su ghiaccio per 30 minuti. Le  
20 cellule T sono state trattate attraverso lo stesso protocollo descritto sopra. L'analisi del legame dell'anticorpo è stata condotta come descritto sopra.

In un esperimento separato, gli anticorpi sono stati esaminati per il legame alla LAG-3 della scimmia cynomolgus adoperando cellule T attivate di scimmia cynomolgus. L'attivazione in vitro di queste cellule T di scimmia è stata ottenuta attraverso un trattamento delle cellule T con anti-CD3/anti-CD28, adoperando essenzialmente lo stesso



protocollo descritto sopra per l'attivazione in vitro delle cellule T umane, seguito da un'analisi in citometria di flusso come descritto sopra per la colorazione delle cellule T CD4<sup>+</sup> umane attivate in vitro.

I risultati dell'analisi in citometria di flusso, ottenuti utilizzando le cellule CHO contenenti la LAG-3 di rhesus e le cellule T attivate di cynomolgus, sono riepilogati nella Tabella 3, che mostra le EC<sub>50</sub> per il legame ai due tipi differenti di cellule che esprimono una LAG-3 di scimmia. Questi risultati mostrano che tutti gli anticorpi si legano efficacemente sia alla LAG-3 sulle cellule T attivate di cynomolgus che alla LAG-3 di rhesus (SEQ ID NO:93) trasferita nelle cellule CHO. Tuttavia, c'è una gerarchia nelle affinità di legame, con il clone 26H10 che mostra l'affinità più alta, in particolare un'affinità che è rispettivamente circa 2,5 e 6 volte superiore rispetto a quelle dei cloni 8B7 e 25F7. La differenza nella gerarchia di legame tra i due tipi di cellule potrebbe riflettere le differenze tra le proteine LAG-3 di rhesus e cynomolgus in termini di sequenza di amminoacidi.

Tabella 3: Legame degli anticorpi anti-LAG-3 alla LAG-3 di scimmia

Anticorpo	Cellule T CD4 <sup>+</sup> attivate di cyno, EC <sub>50</sub> (nM)	LAG3 di rhesus in CHO, EC <sub>50</sub> (nM)
26H10	5,19	4,684
25F7	14,18	22,72
8B7	30,45	10,01

#### 4. Legame ad un antigene LAG-3 di topo

Per determinare se gli anticorpi cross-reagissero con la LAG-3 murina, sono stati condotti degli studi in citometria di flusso simili a quelli descritti sopra, ma usando come cellula bersaglio una linea cellulare di ibridoma murino a cellule T (3A9) che era stata trasferita per esprimere la LAG-3 murina sulla superficie delle cellule, procedendo poi con un'analisi FACS per rilevare il legame dell'anticorpo. I risultati hanno indicato che, al contrario di un anticorpo anti-LAG-3 murina di controllo che mostrava una forte colorazione, nessuno degli anticorpi umani 25E3, 25F7, 8B7 o 26H10 mostrava un legame alla LAG-3 murina di superficie cellulare sopra i livelli di sfondo, dimostrando che nessuno di questi anticorpi cross-reagisce con la LAG-3 murina.

#### 20 B. Analisi in BIACORE



Il legame degli anticorpi 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 e 17E5 ad una proteina LAG-3 ricombinante è stato esaminato via BIAcore™ adoperando un metodo di cattura. Ciascuno degli anticorpi 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 e 17E5 è stato catturato adoperando un anti-CH1, un anticorpo reagente che è specifico per la regione costante di catena pesante 1 di un anticorpo umano (Zymed, Clone HP6045, conc. soluzione madre 1,0 mg/mL). L'anti-CH1 è stato rivestito su un chip CM5 (BR-1000-14, grado ricerca) ad un'alta densità (9700-11500 RU). Il rivestimento è stato condotto basandosi sulla procedura di immobilizzazione standard raccomandata dal produttore. L'anticorpo 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 o 17E5 purificato, con concentrazioni nel campo di 0,5-3 µg/mL, è stato poi catturato sulla superficie rivestita con l'anti-CH1 alla portata di 10 µL/min. per 1 minuto. Sull'anticorpo catturato è stata iniettata, per 3 minuti ad una portata di 25 µg/mL, una singola concentrazione della proteina di fusione ricombinante contenente la LAG-3 umana (20 nM). L'antigene è stato lasciato dissociare per 7,5 minuti. Dopo ogni ciclo, la superficie del chip veniva rigenerata con 25 µL di NaOH 25 mM seguiti da 30 µL di lavaggio con HBS-EP. Il chip comprendeva dei controlli isotipici i cui dati sono stati usati per sottrarre il legame aspecifico. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su uno strumento di risonanza plasmonica di superficie Biacore 3000 che adoperava il software BIAcore Control v 3.2. L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando il software BiaEvaluation v3.2. I risultati sono mostrati sotto nella Tabella 4. I risultati di Biacore per 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 e 17E5 confermano i risultati della citometria di flusso, ovvero che tutti e cinque gli anticorpi sono in grado di legarsi alla LAG-3 umana con un'alta affinità.

Tabella 4: Cinetica di legame dell'anticorpo anti-LAG-3 ad una LAG-3 umana ricombinante

Anticorpo	$K_D \times 10^{-9}$ (M)
25E3	0,09
8B7	0,09
26H10	0,10
25F7	0,47
17E5	4,53

### C. Mappatura sull'epitoma



Nella proteina LAG-3, il primo dominio immunoglobulino-simile della regione extracellulare contiene una "ansa supplementare" esposta avente la sequenza di amminoacidi: GPPAAAPGHPLAPGPHP AAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO:79). Per esaminare il legame di 25E3, 25F7, 8B7 e 26H10 a questa regione di LAG-3, e per mappare l'epitopo legato da ogni anticorpo, è stato condotto un esperimento di scansione peptidica attraverso questa regione. È stata preparata, e coniugata con biotina, una serie di 10 peptidi sovrapposti che scansionavano l'intera lunghezza della sequenza dell'ansa supplementare. Per l'analisi in ELISA, i coniugati peptide di ansa-biotina, applicati in un volume di 100 µl ad una concentrazione di 2 µg/mL, sono stati catturati adoperando piastre di microtitolazione pre-rivestite con streptavidina (Sigma-Aldrich, n° cat. M5432) e incubati per 18 ore a 4°C, dopo di che le piastre sono state lavate 3 volte e bloccate, a temperatura ambiente per 1 ora, con un tampone bloccante (PBS 1x + FBS 10%). Successivamente, sono stati applicati gli anticorpi anti-LAG-3 umani sottoposti a diluizione seriale 3x in tampone bloccante da 10 µg/mL, e le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 2 ore prima di lavarle tre volte. Per rilevare l'anticorpo umano legato, un anticorpo anti-catena leggera kappa umana di capra coniugato con HRP (Bethyl Laboratories, n° cat. A80-115P) è stato diluito a 1 µg/mL in tampone bloccante e applicato ai pozzetti di saggio per 1 ora, procedendo poi a tre lavaggi e all'applicazione del substrato TMB (eBioscience, n° cat. 00-4201-56). Le letture della densità ottica ad una lunghezza d'onda di 650 nm sono state effettuate su uno spettrofotometro Spectramax 340PC (Molecular Dynamics, Inc.). I risultati dell'esperimento di scansione peptidica sono riepilogati sotto nella Tabella 5.

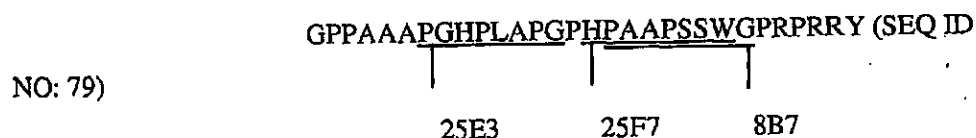
Tabella 5: Legame di un anticorpo anti-LAG alla scansione peptidica dell'ansa supplementare di LAG-3

Scansione peptidica dell'ansa supplementare di LAG-3	SEQ				
GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRY	79	25E3	8B7	25F7	26H10
GPPAAAPGHPLA	80	-	-	-	-
PAAAPGHPLAPG	81	++	-	-	-
AAPGHPLAPGPH	82	++	-	-	-
PGHPLAPGPHPA	83	+	-	-	-
HPLAPGPHPAAP	84	±	-	-	-

LAPGPHPAAPSS	85	-	-	-	-
PGPHPAAPSSWG	86	-	++	++	-
PHPAAPSSWGPR	87	-	++	++	-
PAAPSSWGPRPR	88	-	++	+	-
APSSWGPRPRRY	89	-	-	-	-

5 Sulla base di questi risultati, è stato determinato che l'anticorpo 25E3 riconosceva una regione all'interno dell'ansa extracellulare che comprendeva la sequenza di amminoacidi PGHPLAPG (SEQ ID NO:76), mentre l'anticorpo 25F7 riconosceva una regione all'interno dell'ansa extracellulare che comprendeva la sequenza di amminoacidi HPAAPSSW (SEQ ID NO:77) e 8B7 sembrava riconoscere una regione all'interno dell'ansa extracellulare che comprendeva la sequenza di amminoacidi PAAPSSWG (SEQ ID NO:78). Al contrario, con l'anticorpo 26H10, non era possibile rilevare alcun legame al peptide di ansa supplementare di lunghezza integrale o ad uno qualsiasi dei peptidi di scansione più corti.

Le regioni identificate in questo studio sono sottolineate nella sequenza dell'ansa supplementare di lunghezza integrale:



10

Pertanto, i risultati della scansione peptidica indicano che gli anticorpi 25E3, 25F7 e 8B7 si legano ad epitopi differenti ma vicini all'interno della LAG-3 umana.

15 Per esaminare ulteriormente il legame di questi anticorpi alla regione peptidica dell'ansa supplementare, sono stati condotti altri saggi ELISA. In un saggio ELISA che utilizzava il peptide di ansa supplementare di lunghezza integrale di essere umano (SEQ ID NO:79), sono stati determinati i valori di EC<sub>50</sub> per il legame di 25E3, 25F7 e 8B7. Inoltre, un ELISA peptidico simile è stato condotto utilizzando la sequenza del peptide di ansa supplementare di lunghezza integrale della LAG-3 di scimmia rhesus avente la sequenza



5 GPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRY (SEQ ID NO:90), procedendo poi a determinare i valori di EC<sub>50</sub> per il legame di 25F7 e 8B7. I risultati sono riepilogati sotto nella Tabella 6. I risultati confermano che gli anticorpi 25E3, 25F7 e 8B7 sono in grado di riconoscere la regione peptidica dell'ansa supplementare della LAG-3 umana. Inoltre, gli anticorpi 25F7 e 8B7 si legano anche alla regione peptidica dell'ansa supplementare della LAG-3 di rhesus, seppure in misura minore rispetto alla sequenza umana, cosa che può essere dovuta alla divergenza di specie di questo polipeptide in termini di sequenza. I risultati confermano che l'anticorpo 26H10 non è in grado di riconoscere il peptide di ansa supplementare di LAG-3.

Tabella 6: Legame degli anticorpi anti-LAG-3 al peptide di ansa supplementare delle LAG-3 di essere umano e di rhesus


Anticorpo	Ansa supplementare umana, EC <sub>50</sub> (nM)	Ansa supplementare di rhesus, EC <sub>50</sub> (nM)
25E3	0,55	Non esaminato
25F7	0,29-0,95	13,09
8B7	0,28-1,35	0,60
26H10	Nessun legame	Nessun legame

10 Esempio 4: Inibizione del legame di LAG-3 alle molecole MHC di classe II da parte degli anticorpi monoclonali anti-LAG-3

Per esaminare la capacità degli anticorpi anti-LAG-3 di inibire il legame di LAG-3 alle molecole MHC di classe II, è stato condotto un saggio di legame in vitro in cui una proteina di fusione contenente LAG-3, che comprende il dominio extracellulare della LAG-3 umana fuso ad un Fc di topo (hLAG-3-mIg), è stata fatta reagire con cellule Daudi che esprimono le molecole MHC di classe II umane.

15

Per esaminare l'inibizione esercitata dagli anticorpi sul legame di LAG-3 alle MHC di classe II, 25E3, 25F7, 8B7 e 26H10 sono stati sottoposti a diluizione seriale da 20 µg/mL in tampone PFAE, e queste diluizioni seriali sono state addizionate con 1 µg/ml della proteina di fusione hLAG-3-mIg. Questa miscela è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente prima di aggiungerla a 2x10<sup>5</sup> cellule Daudi lavate con PFAE 1x. La miscela è stata applicata alle



cellule Daudi e incubata a 4°C per 30 minuti. Le cellule sono state pellettizzate (tre minuti, 400 x g), lavate una volta con tampone PFAE 1x e nuovamente pellettizzate, e il legame di hLAG-3-mIg alle cellule Daudi è stato rilevato utilizzando un reagente secondario anti-Fc $\gamma$  di mIgG marcato con PE e ricombinante. L'analisi del legame di LAG-3-mIg è stata condotta con il citometro di flusso FACScalibur (BD Biosciences). I risultati sono riepilogati nella Tabella 7, che mostra i valori di IC<sub>50</sub> in nM.

Tabella 7: Inibizione del legame di LAG-3 alle MHC di classe II da parte degli anticorpi anti-LAG-3

Anticorpo	IC <sub>50</sub> (nM)
25E3	0,8 - 6,78
25F7	0,12 - 0,92
8B7	0,19 - 0,95
26H10	0,10

I risultati dimostrano che tutti e quattro gli anticorpi sono efficaci nell'inibire il legame di LAG-3 agli anticorpi MHC di classe II, con 25F7, 8B7 e 26H10 che mostrano valori di IC<sub>50</sub> approssimativamente 7 - 13 volte inferiori rispetto a quello di 25E3.

#### 10 Esempio 5: Stimolazione di una risposta a cellule T antigene-specifica da parte dei mAb anti-LAG-3

Per esaminare la capacità degli anticorpi anti-LAG-3 di stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica, è stato adoperato un saggio di stimolazione peptidica delle cellule T 3A9 (vedere ad esempio Workman et al. (2003) *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman et al. (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263).

15 In questo saggio, come cellule T responsive, è stato adoperato un ibridoma a cellule T murino, 3A9, che è specifico per il peptide HEL<sub>48-62</sub>. La cellula T 3A9 responsive è stata trasdotta con mezzi retrovirali in maniera tale che esprimesse la LAG-3 umana o la LAG-3 murina sulla sua superficie cellulare. La cellula di presentazione dell'antigene (APC) usata per presentare l'antigene peptidico HEL<sub>48-62</sub> alle cellule 3A9 era la linea cellulare positiva alle MHC di classe II LK35.2. Degli studi separati hanno stabilito che una proteina di fusione contenente la LAG-3 umana era capace di legarsi alle molecole MHC di classe II di topo, convalidando così l'uso delle APC murine LK35.2 in questo



saggio. La stimolazione antigene-specifica delle cellule 3A9 veniva indicata dalla produzione di interleuchina-2 (IL-2), la cui secrezione è stata misurata via ELISA (kit OptEIA per la IL-2 murina, BD Biosciences, n° cat. 555148, secondo le raccomandazioni del produttore).

5 In assenza di qualsiasi anticorpo, quando le cellule T trasfettate venivano incubate con le APC LK35.2 che presentavano l'antigene peptidico HEL<sub>48-62</sub>, l'espressione ectopica della LAG-3 umana o murina sulle cellule 3A9 determinava un effetto di inibizione sulle risposte antigene-specifiche, come indicato dalla quantità aumentata di antigene peptidico necessaria per stimolare la produzione di IL-2 da parte delle cellule 3A9 rispetto al profilo di risposta alla dose di peptide nelle cellule T 3A9 di controllo.

10 Per esaminare la stimolazione della risposta a cellule T antigene-specifica da parte degli anticorpi, l'APC (2,5x10<sup>4</sup> cellule) è stata innanzitutto incubata con il peptide antigenico (200 nM) per 30 minuti a 37°C, e le cellule T 3A9 (5,0x10<sup>4</sup> cellule che esprimevano mLAG-3, cellule che esprimevano hLAG-3 o cellule di controllo) sono state pre-incubate con un anticorpo anti-hLAG-3 (25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2, 17E5, serialmente diluito in una diluizione 3x da 25 µg/mL) per 15 minuti a 37°C. Le cellule T 3A9 sono state poi aggiunte alle APC impulsive con l'antigene, e la coltura è stata incubata per 24 ore a 37°C. Sono stati quindi raccolti i sovranatanti, in cui è stata misurata la produzione della IL-2 murina. I risultati per le cellule T 3A9 che esprimevano la LAG-3 umana sono riportati nella Tabella 8, che  
15 mostra valori di IC<sub>50</sub> in nM.

Tabella 8: Stimolazione di risposte a cellule T antigene-specifiche da parte degli anticorpi anti-LAG-3

Anticorpo	Saggio peptidico con 3A9-hLAG-3, IC <sub>50</sub> (nM)
25F7	0,14 - 1,94
26H10	1,45 - 6,49
8B7	3,25 - 13,90
25E3	388 - 70,78
11F2	81,50 - 240
17E5	Nessuna inibizione



I risultati mostrano che gli anticorpi 25F7, 8B7 e 26H10 e, in misura minore, 25E3, erano in grado di stimolare la produzione di IL-2 in un saggio di risposta antigene-specifica delle cellule T, mentre l'anticorpo 11F2 mostrava una capacità minima di inibizione e l'anticorpo 17E5 non era funzionale in questo saggio. Nessuno degli anticorpi alterava la produzione misurata di IL-2 da parte delle cellule T 3A9 di controllo o da parte delle cellule T 3A9 trasfettate con la proteina LAG-3 murina, dimostrando la specificità dell'effetto di stimolazione.

Esempio 6: Inibizione della crescita di un tumore da parte di un mAb anti-LAG-3, da solo o in combinazione

Per esaminare la capacità di un anticorpo anti-LAG-3, da solo o in combinazione con un altro anticorpo immunostimolante, di inibire la crescita delle cellule tumorali in vivo, sono stati utilizzati due modelli differenti di innesto tumorale in topo singenico. Il primo modello adoperava delle cellule di fibrosarcoma murino Sa1N. Il secondo modello utilizzava la linea cellula di cancro del colon murino MC38.

In un primo esperimento, ciascuno dei topi (ceppo A/J) è stato impiantato con  $2 \times 10^6$  cellule di fibrosarcoma Sa1N il giorno 0, e le cellule tumorali sono state lasciate crescere per sette giorni. Il giorno 7, il giorno 10 e il giorno 12 post-impianto, i topi sono stati trattati con 10 mg/kg di un mAb anti-LAG-3 da solo (il mAb anti-LAG-3 murina di ratto C9B7W; eBioscience, n° cat. 14-2231), di un anticorpo anti-PD-L1 da solo (il mAb anti-PD-L1 murina 14D8), degli anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-L1 in combinazione, o di un anticorpo di controllo di isotipo IgG1. Il mAb 14D8 è un anticorpo anti-PD-L1 murina di ratto che è stato chimerizzato per contenere le regioni costanti di IgG1 murina e kappa murina.

I volumi dei tumori nei topi sono stati misurati per oltre 50 giorni dopo l'impianto, procedendo poi a determinare i volumi medi e mediani dei tumori. È stata calcolata l'inibizione media della crescita tumorale (basata sul trattamento con l'anticorpo di controllo di isotipo IgG1, che corrispondeva ad un'inibizione di 0%). I risultati per il giorno 24 post-impianto sono riepilogati sotto nella Tabella 9:

Tabella 9: Inibizione media della crescita tumorale nel modello di tumore Sa1N

Giorno	IgG1	LAG-3	PD-L1	Combo
24	-	68	74,9	95,8



5 Pertanto, il trattamento con l'anticorpo anti-LAG3 da solo o con l'anticorpo anti-PD-L1 da solo induceva un'inibizione della crescita tumorale, mentre la combinazione di entrambi gli anticorpi produceva un'inibizione ancora maggiore della crescita tumorale. Con riferimento ai gruppi di trattamento, al termine dell'esperimento, i risultati erano che 4 dei 10 topi trattati con l'anti-LAG3 da solo diventavano liberi dal tumore, mentre solo 1 dei 10 topi trattati con l'anticorpo ad IgG1 di controllo diventava libero dal tumore. In maniera simile, 4 degli 11 topi trattati con l'anti-PD-L1 da solo venivano resi liberi dal tumore. Il trattamento dei topi con la combinazione di anti-LAG3 e anti-PD-L1 permetteva di ottenere 9 topi su 10 liberi dal tumore; il topo rimanente, non libero dal tumore, aveva un tumore indolente che rimaneva piccolo durante tutto lo studio.

10 Due studi ulteriori hanno utilizzato topi impiantati con cellule della linea cellula di cancro del colon murino MC38. Nel primo esperimento, ciascuno dei topi C57BL/6 è stato impiantato con  $2 \times 10^6$  cellule MC38 il giorno 0 e trattato, il giorno 7, il giorno 10 e il giorno 12 post-impianto, con 200  $\mu\text{g}/\text{dose}$  di un anti-LAG-3 da solo (il mAb C9B7W), un anti-PD-1 da solo (il mAb 4H2) o un anti-LAG-3 e un anti-PD-1 in combinazione. Come controllo, è stato adoperato un anticorpo di isotipo IgG1 abbinato a 400  $\mu\text{g}/\text{dose}$ . Il mAb 4H2 è un anticorpo anti-PD-1 murina di ratto che è stato chimerizzato per contenere le regioni costanti di IgG1 murina e kappa murina.

15 80 giorni dopo l'impianto, sono stati determinati il volume medio dei tumori, il volume mediano dei tumori e la % di sopravvivenza. I risultati hanno mostrato che la monoterapia con l'anti-LAG-3 in questo modello tumorale (MC38) mostrava un'attività scarsa o nulla di inibizione della crescita tumorale, e nessuno dei topi trattati sopravviveva alla durata dell'esperimento. Al contrario, la monoterapia con l'anti-PD-1 mostrava un'attività significativa, con 4 dei 10 topi che erano liberi dal tumore alla conclusione dell'esperimento. Inoltre, in maniera simile ai risultati ottenuti con il modello Ss1N, la terapia di combinazione con l'anti-LAG-3 più l'anti-PD-1 era più efficace di uno qualsiasi dei due  
20 trattamenti da soli, con 7 topi su 8 che erano liberi dal tumore al termine dell'esperimento.

25 In un secondo esperimento con il modello MC38, ciascuno dei topi C57BL/6 è stato impiantato con  $2 \times 10^6$  cellule MC38 il giorno 0 e trattato, il giorno 5, il giorno 8 e il giorno 11 post-impianto, con 200  $\mu\text{g}/\text{dose}$  di un anticorpo di test e/o con 400  $\mu\text{g}/\text{dose}$  di un anticorpo ad IgG di controllo nel seguente modo: (i) un anticorpo anti-IgG1 di controllo; (ii) un mAb anti-LAG-3 (mAb C9B7W) insieme alla IgG1 di controllo; (iii) un anticorpo anti-PD-1 (4H2)

insieme alla IgG1 di controllo; (iv) un anticorpo anti-CTLA-4 (il mAb anti-CTLA-4 murina di topo 9D9) insieme alla IgG1 di controllo; (v) il mAb anti-LAG-3 insieme al mAb anti-PD-1; o (vi) il mAb anti-LAG-3 insieme al mAb anti-CTLA-4. Il mAb 9D9 è un anticorpo anti-CTLA-4 murina di topo sviluppato in un topo in cui il CTLA-4 murino endogeno era stato sottoposto a knock-out.

5           100 giorni dopo l'impianto, sono stati determinati il volume medio dei tumori, il volume mediano dei tumori e la % di sopravvivenza. I risultati erano simili a quelli del primo esperimento, dato che la monoterapia con l'anti-LAG-3 mostrava un'attività scarsa o nulla di inibizione della crescita del tumore MC38, e nessuno dei topi trattati sopravviveva alla durata dell'esperimento. Anche la monoterapia con l'anti-CTLA-4 mostrava un'attività scarsa o nulla di inibizione della crescita del tumore MC38, e nessuno dei topi trattati sopravviveva alla durata dell'esperimento. Al contrario, la  
10           monoterapia con l'anti-PD-1 mostrava nuovamente un'attività significativa, con 4 dei 10 topi che erano liberi dal tumore alla conclusione dell'esperimento. Inoltre, anche questa volta, la terapia di combinazione era più efficace rispetto alla monoterapia. Per i topi trattati con la combinazione di anti-LAG-3 e anti-CTLA-4, 3 topi su 10 erano liberi dal tumore al termine dell'esperimento mentre, per i topi trattati con la combinazione di anti-LAG-3 e anti-PD-1, 8 topi su 10 erano liberi dal tumore alla conclusione dell'esperimento.

15           Pertanto, i sopra descritti studi di innesto tumorale in vivo hanno dimostrato che, almeno per certi modelli di tumore, il trattamento con un anticorpo anti-LAG da solo produceva un'inibizione significativa della crescita tumorale in vivo. Inoltre, per molteplici modelli di tumore, la terapia di combinazione comprendente un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1, un anticorpo anti-PD-L1 o un anticorpo anti-CTLA-4 dava luogo ad un'attività anti-tumorale ancora maggiore rispetto alla monoterapia da sola.

20           Esempio 7: Promozione dell'autoimmunità nei topi NOD attraverso l'inibizione esercitata da un mAb anti-LAG-3

            Per esaminare la capacità di un anticorpo anti-LAG-3 di stimolare una risposta immunitaria, come indicato dallo sviluppo di un'autoimmunità, è stato adoperato il modello di diabete nel topo NOD. È noto che i topi NOD sono inclini a sviluppare un diabete autoimmune. La progressione del diabete nei topi NOD femmine può essere monitorata misurando il glucosio nel siero. Pertanto, è stato esaminato l'effetto del trattamento con un anti-LAG-3, da solo o in  
25           combinazione con anticorpi immunostimolanti, sullo sviluppo del diabete nei topi NOD femmine.



I topi NOD femmine sono stati trattati il giorno 0, il giorno 2 e il giorno 5 con 250 µg/dose di: (i) un anticorpo di controllo di isotipo IgG1; (ii) un mAb anti-LAG-3 da solo (mAb C9B7W); (iii) un mAb anti-PD-1 da solo (mAb 4H2); (iv) un mAb anti-CTLA-4 da solo (mAb 9D9); (v) un mAb anti-LAG-3 insieme ad un mAb anti-PD-1; o (vi) un mAb anti-LAG-3 insieme ad un mAb anti-CTLA-4. I risultati hanno dimostrato che il trattamento con l'anti-LAG-3 da solo o il trattamento con l'anti-PD-1 da solo (ma non il trattamento con l'anti-CTLA-4 da solo) aumentava il numero di topi che si convertivano al fenotipo diabetico. Inoltre, il trattamento di combinazione comprendente l'anti-LAG-3 più l'anti-PD-1, o l'anti-LAG-3 più l'anti-CTLA-4, era ancora più efficace nel convertire i topi al fenotipo diabetico.

Pertanto, questi risultati dimostrano che il blocco dell'interazione di LAG-3 con il suo recettore interferiva con un segnale immunoregolatore negativo che permetteva una maggiore attività immunologica nei topi NOD, e che questa maggiore attività immunologica nei topi trattati con l'anti-LAG-3 poteva essere potenziata da un trattamento di combinazione con un anticorpo anti-PD-1 o anti-CTLA-4.

#### Esempio 8: Immunoistochimica con l'uso dei mAb anti-LAG-3

In questo esperimento, degli anticorpi umani anti-LAG-3 marcati in fluorescenza sono stati usati in esperimenti di immunoistochimica. Sono stati usati i seguenti anticorpi anti-LAG-3 umani marcati con FITC: 25F7-FITC (F:P = 2,9; versione IgG1); 25F7-G4-FITC (F:P = 2,7; versione IgG4); 8B7-FITC (F:P = 2,6) e 26H10-FITC (F:P = 3,4). È stato esaminato un gruppo di tessuti linfoidi, nello specifico tonsilla (due campioni), milza (due campioni) e timo (due campioni), insieme ad un tessuto ipofisario (quattro campioni). Come controllo, sono state usate delle cellule CHO trasfettate con LAG-3. Sono state utilizzate delle sezioni al criostato fissate in acetone. Le sezioni sono state prima colorate con l'anticorpo anti-LAG-3 marcato con FITC (0,2-5 µg/ml), poi colorate con un anticorpo anti-FITC di coniglio che agiva da anticorpo ponte, e infine visualizzate utilizzando il kit EnVision<sup>TM</sup>+ System di coniglio (Dako USA, Carpinteria, CA). I risultati sono riepilogati sotto nella Tabella 10.

Tabella 10: Immunoistochimica con l'uso dei mAb anti-LAG-3

Tessuto	25F7-FITC	25F7-G4-FITC	8B7-FITC	26H10-FITC
Cellule	+ (intensa)	+ (intensa)	+ (intensa)	+ (intensa)

CHO/LAG-3				
Tonsilla (n=2)	+ (intensa; rarefatta negli LC sparsi, 2/2)	+ (intensa; rarefatta negli LC sparsi, 2/2)	+ (intensa; rarefatta negli LC sparsi, 2/2)	+ (intensa; rarefatta negli LC sparsi, 2/2)
Milza (n=2)	+ (molto debole, principalmente nella polpa rossa, 2/2)	+ (molto debole, principalmente nella polpa rossa, 2/2)	+ (debole, principalmente nella polpa rossa, 2/2)	+ (molto debole, principalmente nella polpa rossa, 2/2)
Timo (n=2)	+ (intensa; molto rarefatta negli LC sparsi, 1/2)	+ (intensa; molto rarefatta negli LC sparsi, 1/2)	+ (intensa; molto rarefatta negli LC sparsi, 1/2)	+ (intensa; molto rarefatta negli LC sparsi, 1/2)
Ipofisi (n=4)	+ (intensa; occasionale nell'adeno-ipofisi, 3/4)	+ (intensa; occasionale nell'adeno-ipofisi, 3/4)	-	+ (intensa; occasionale nell'adeno-ipofisi, 3/4; debole-moderata, rarefatta, 1/4)
LC = linfociti; + = colorazione positiva; - = colorazione negativa				

Come previsto, l'espressione di LAG-3 è stata rilevata nel pannello del tessuto linfoide. Inoltre, due dei tre anticorpi anti-LAG-3 esaminati, 25F7 (versioni IgG1 e IgG4) e 26H10, mostravano una ritenzione nel tessuto ipofisario, mentre uno solo degli anticorpi esaminati, 8B7, non mostrava questa ritenzione nel tessuto ipofisario. Di conseguenza, l'esperimento in immunostochimica ha identificato due sottoinsiemi di anticorpi anti-LAG-3, in cui un sottoinsieme viene trattenuto nel tessuto ipofisario e l'altro sottoinsieme non viene trattenuto nel tessuto ipofisario.

5

## RIEPILOGO DEL LISTATO DELLE SEQUENZE


SEQ ID NO:	SEQUENZA	SEQ ID NO:	SEQUENZA
1	V <sub>H</sub> , CDR1, a.a., 25F7	49	V <sub>H</sub> , n.t., 25F7



2	V <sub>H</sub> , CDR1, a.a., 26H10	50	V <sub>H</sub> , n.t., 26H10
3	V <sub>H</sub> , CDR1, a.a., 25E3	51	V <sub>H</sub> , n.t., 25E3
4	V <sub>H</sub> , CDR1, a.a., 8B7	52	V <sub>H</sub> , n.t., 8B7
5	V <sub>H</sub> , CDR1, a.a., 11F2	53	V <sub>H</sub> , n.t., 11F2
6	V <sub>H</sub> , CDR1, a.a., 17E5	54	V <sub>H</sub> , n.t., 17E5
7	V <sub>H</sub> , CDR2, a.a., 25F7	55	V <sub>K</sub> , n.t., 25F7
8	V <sub>H</sub> , CDR2, a.a., 26H10	56	V <sub>K</sub> , n.t., 26H10
9	V <sub>H</sub> , CDR2, a.a., 25E3	57	V <sub>K</sub> , n.t., 25E3
10	V <sub>H</sub> , CDR2, a.a., 8B7	58	V <sub>K</sub> , n.t., 8B7
11	V <sub>H</sub> , CDR2, a.a., 11F2	59	V <sub>K</sub> , n.t., 11F2
12	V <sub>H</sub> , CDR2, a.a., 17E5	60	V <sub>K</sub> , n.t., 17E5
13	V <sub>H</sub> , CDR3, a.a., 25F7	61	V <sub>H</sub> 4-34, linea germinale, a.a.
14	V <sub>H</sub> , CDR3, a.a., 26H10	62	V <sub>H</sub> JH5b, linea germinale, a.a.
15	PVGVV	63	V <sub>k</sub> L6, linea germinale, a.a.
16	V <sub>H</sub> , CDR3, a.a., 8B7	64	V <sub>k</sub> JK2, linea germinale, a.a.
17	V <sub>H</sub> , CDR3, a.a., 11F2	65	V <sub>H</sub> 3-33, linea germinale, a.a.
18	V <sub>H</sub> , CDR3, a.a., 17E5	66	V <sub>H</sub> JH6b, linea germinale, a.a.
		67	V <sub>k</sub> A 27, linea germinale, a.a.
19	V <sub>K</sub> , CDR1, a.a., 25F7	68	V <sub>k</sub> JK3, linea germinale, a.a.
20	V <sub>K</sub> , CDR1, a.a., 26H10	69	V <sub>H</sub> 3-20, linea germinale, a.a.
21	V <sub>K</sub> , CDR1, a.a., 25E3		
22	V <sub>K</sub> , CDR1, a.a., 8B7	70	V <sub>H</sub> JH4b, linea germinale, a.a.



23	V <sub>K</sub> , CDR1, a.a., 11F2	71	V <sub>k</sub> L-18, linea germinale, a.a.
24	V <sub>K</sub> , CDR1, a.a., 17E5	72	V <sub>k</sub> JK4, linea germinale, a.a.
		73	V <sub>H</sub> 1-24, linea germinale, a.a.
25	V <sub>K</sub> , CDR2, a.a., 25F7	74	V <sub>k</sub> JK1, linea germinale, a.a.
26	V <sub>K</sub> , CDR2, a.a., 26H10	75	V <sub>k</sub> JK5, linea germinale, a.a.
27	V <sub>K</sub> , CDR2, a.a., 25E3		
28	V <sub>K</sub> , CDR2, a.a., 8B7	76	PGHPLAPG
29	V <sub>K</sub> , CDR2, a.a., 11F2	77	HPAAPSSW
30	V <sub>K</sub> , CDR2, a.a., 17E5	78	PAAPSSWG
		79	GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSW GPRPRRY
31	V <sub>K</sub> , CDR3, a.a., 25F7	80	GPPAAAPGHPLA
32	V <sub>K</sub> , CDR3, a.a., 26H10	81	PAAAPGHPLAPG
33	V <sub>K</sub> , CDR3, a.a., 25E3	82	AAPGHPLAPGPH
34	V <sub>K</sub> , CDR3, a.a., 8B7	83	PGHPLAPGHPA
35	V <sub>K</sub> , CDR3, a.a., 11F2	84	HPLAPGHPAAP
36	V <sub>K</sub> , CDR3, a.a., 17E5	85	LAPGHPAAPSS
		86	PGHPAAPSSWG
37	V <sub>H</sub> , a.a., 25F7	87	PHPAAPSSWGPR
38	V <sub>H</sub> , a.a., 26H10	88	PAAPSSWGPRPR
39	V <sub>H</sub> , a.a., 25E3	89	APSSWGPRPRRY
40	V <sub>H</sub> , a.a., 8B7	90	GPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRY



41	V <sub>H</sub> , a.a., 11F2		
42	V <sub>H</sub> , a.a., 17E5	91	atgtgggaggctcagttcctg
		92	gtcagagctgctccggctc
43	V <sub>K</sub> , a.a., 25F7	93	Rhesus, clone LAG-3 pa23-5, a.a.
44	V <sub>K</sub> , a.a., 26H10	94	Rhesus, LAG-3, a.a. (XM_001108923)
45	V <sub>K</sub> , a.a., 25E3		
46	V <sub>K</sub> , a.a., 8B7		
47	V <sub>K</sub> , a.a., 11F2		
48	V <sub>K</sub> , a.a., 17E5		

## LISTATO DELLE SEQUENZE

&lt;110&gt; Medarex, Inc.

&lt;120&gt; Anticorpi umani che legano il gene di attivazione dei linfociti-3 (LAG-3) e loro usi

&lt;130&gt; MXI-392PC

5 &lt;140&gt;

&lt;141&gt; 11-08-2009

&lt;150&gt; US 61/188548

&lt;151&gt; 11-08-2008

&lt;160&gt; 94

10 &lt;170&gt; PatentIn, versione 3.4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

15 &lt;400&gt; 1

Asp Tyr Tyr Trp Asn  
1 . . . . . 5  
<210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
<400> 2  
Ser Tyr Gly Met His  
1 . . . . . 5  
<210> 3  
<211> 5  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 3  
Asp Tyr Gly Met Ser  
1 . . . . . 5  
<210> 4  
15 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 4  
Gly Tyr Tyr Trp Ser  
1 . . . . . 5  
20 <210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



<400> 5

Glu Val Ser Met His  
1 5

<210> 6

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 7

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

15 <210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

20 Gly

<210> 9



<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

5 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Cys Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 11

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 12

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 12

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro  
1 5 10

<210> 14

10 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

15 <210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

20

<210> 16



<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

5 Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Glu Asp Ser  
1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 17

Ala Phe Val Val Val Val Ala Ala Ser Asp Tyr  
1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 18

Asp Pro His Cys Ser Ser Thr Asn Cys Tyr Leu Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 19

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10



<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Ala Leu Ala  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

<210> 22

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

<210> 23

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23



Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 25

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 26

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

20 <210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 27

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 28

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asn Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 29

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

15 <210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

20 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT



<213> Homo sapiens  
<400> 31  
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5  
<210> 32  
5 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 32  
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr  
1 5  
10 <210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 33  
15 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5  
<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
20 <400> 34  
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5  
<210> 35  
<211> 9



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Trp	Thr
1				5				

5 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

10 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr  
1 5

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 39

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39



Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Thr Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 40



Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Cys Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ala Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Glu Asp Ser Trp Gly Pro  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 41

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 41

Thr His Asp Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
1 5 10 15

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu  
20 25 30

Thr Glu Val Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala  
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp  
65 70 75 80

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Phe Val Val Val Val Ala Ala Ser Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 42

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Eys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro His Cys Ser Ser Thr Asn Cys Tyr Leu Phe Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15



Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 44



Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 46



Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 47

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47



Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 49

<211> 360

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49



caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120  
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180  
cogtccctca agagtcgagt cacccatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240  
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt 300  
gactacgagt acaactgggt cgaccctgg gcccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 50

<211> 366

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 50

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaatgg 300  
gcagtggcct cctgggacta cggtatggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc 360  
tcctca 366


<210> 51

<211> 336

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51



gaggtgcagt tggtagagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120  
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacatattat 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccggagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtac cactgggggc 300  
 tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tctca 336

<210> 52

<211> 360

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 52

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc catcggaac cctgtccctc 60  
 acctgcgctg tctatggtgg gtcctcagc ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120  
 ccaggaaggg ggctggagtg gattggggaa atcaatcacc gtggaaacac caactgcaac 180  
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ggagatacgt ccaagaaaca gttcgccctg 240  
 aagctgaact ctgtgaccgc cgcgacacag gctgtctatt actgtgagag aggatacgat 300  
 attttgactg gttattatga ggactcctgg ggcccgggaa ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 53

<211> 369

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53



```

accacgacc aggtccagct ggtacagtct ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca      60
gtgaaggctc cctgcaaggt ttccggatac accctcactg aagtatccat gcactgggtg      120
cgacaggctc ctggaaaagg gottgagtgg atgggagggt ttgatcctga agatggtgaa      180
acaatctacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacatga ccgaggacac atctacagac      240
acagcctaca tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgca      300
acagcctttg tagtgggtgg agctgcttct gactactggg gccagggaac cctggtcacc      360
gtctctca                                     369

```

<210> 54

<211> 369

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 54

```

caggtgcacc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgocaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccc      300
cattgtagta gtaccaactg ctacctttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc      360
gtctctca                                     369

```

<210> 55

<211> 321

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 55

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc    60
ctctcctgca gggccagtc gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct    120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc    180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct    240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac ttttggccag    300
gggaccaacc tggagatcaa a                                     321
    
```

<210> 56

<211> 324

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc    60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa    120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca    180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag    240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccatt cactttcggc    300
cctgggacca aagtggatat caaa                                     324
    
```

<210> 57

10 <211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

```

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggbaagtca gggcattagg agtgctttag cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

```

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 321

5 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 58

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctataat gcatccaaca gggcactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

&lt;210&gt; 59

10 &lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 59



```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactotca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

```

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 60

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactotca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccctatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

```

&lt;210&gt; 61

10 &lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARATTERE\_MISTO

15 &lt;222&gt; (98)..(98)



<223> Il residuo 98 viene presentato solo in un sottoinsieme di figure.

<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly

<210> 62

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARATTERE\_MISTO

10 <222> (1)..(3)

<223> I residui 1-3 vengono presentati solo in un sottoinsieme di figure.



<400> 62

Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10 15

<210> 63

<211> 95

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro  
85 90 95

<210> 64

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>



<221> CARATTERE\_MISTO

<222> (1)..(1)

<223> Il residuo 1 viene presentato solo in un sottoinsieme di figure.

<400> 64

5

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

<210> 65

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
. . . . . 20 . . . . . 25 . . . . . 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
. . . . . 35 . . . . . 40 . . . . . 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 . . . . . 55 . . . . . 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 . . . . . 70 . . . . . 75 . . . . . 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
. . . . . 85 . . . . . 90 . . . . . 95

Ala Arg

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

5 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10 15

<210> 67

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 67

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

5 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
1 5 10

<210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys  
85 90 95

Ala Arg



<210> 70

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CARATTERE\_MISTO

<222> (1)..(2)

<223> I residui 1-2 vengono presentati solo in un sottoinsieme di figure.

<400> 70

10

Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5						10			

<210> 71

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 71

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro  
 85 90 95

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 72

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 73

<211> 101

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73





<400> 75

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
1                    5                                    10

<210> 76

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly  
1                    5

<210> 77

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp  
1                    5

15 <210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

20 Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly  
1                    5

<210> 79

<211> 30

<212> PRT



<213> Homo sapiens

<400> 79

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His  
1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr  
20 25 30

<210> 80

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala  
1 5 10

10 <210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly  
1 5 10

15 <210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 82

Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His  
1 5 10



<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 83

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala  
1                    5                                    10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 84

His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro  
1                    5                                    10

<210> 85

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser  
1                    5                                    10

<210> 86

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86



Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly  
1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 87

Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg  
1 5 10

<210> 88

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg  
1 5 10

<210> 89

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr  
1 5 10

20 <210> 90

<211> 30

<212> PRT

<213> Macaca sp.

<400> 90

Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro Ala Pro Gly His Arg  
1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr  
20 25 30

<210> 91

<211> 21

5 <212> DNA

<213> Artificiale

<220>

<223> primer 5Mcyn1408

<400> 91

10 atgtgggagg ctcagttcct g 21

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificiale

15 <220>

<223> primer 3Mcyn1408a

<400> 92

gtcagagctg ctccggctc 19

<210> 93

20 <211> 532

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 93

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp  
 1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val  
 20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile  
 35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln  
 50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro  
 65 70 75 80

Ala Pro Gly His Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro  
 85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly  
 100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln  
 115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala  
 130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Thr Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro  
 165 170 175

Gly Ser Leu Arg Thr Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser  
 180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln  
 195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Gln Gly Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser  
 210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro His Val Gly Pro Met Asp Ser Gly Leu Trp Gly  
 225 230 235 240  
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn  
 245 250 255  
 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Ala Thr Pro Leu Val Tyr Ala Gly  
 260 265 270  
 Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Ala Val Gly  
 275 280 285  
 Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly Pro  
 290 295 300  
 Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg Leu  
 325 330 335  
 Gln Gly Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val  
 340 345 350  
 Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu Cys  
 355 360 365  
 Glu Val Thr Pro Ala Ser Gly Gln Glu His Phe Val Trp Ser Pro Leu  
 370 375 380  
 Asn Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala Gln  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln Gly  
 405 410 415  
 Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser Pro  
 420 425 430  
 Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Arg Ala Gly His  
 435 440 445  
 Leu Pro Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Phe Leu Leu Leu Leu Val  
 450 455 460



Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro Arg  
465 470 475 480

Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln Ser  
485 490 495

Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Pro Glu  
500 505 510

Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro Glu  
515 520 525

Pro Glu Gln Leu  
530

<210> 94

<211> 533

<212> PRT

5 <213> Macaca mulatta

<400> 94

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp  
 1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val  
 20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile  
 35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln  
 50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro  
 65 70 75 80

Ala Pro Gly His Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro  
 85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly  
 100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln  
 115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala



Leu Asn Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala  
 385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln  
 405 410 415

Gly Glu Thr Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser  
 420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Arg Ala Gly  
 435 440 445

His Leu Pro Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Phe Leu Leu Leu Leu  
 450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro  
 465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln  
 485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Pro  
 500 505 510

Glu Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro  
 515 520 525

Glu Pro Glu Gln Leu  
 530



#### RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo monoclonale isolato, o sua porzione legante l'antigene, che lega il gene di attivazione dei linfociti 3 (LAG-3) umano, in cui l'anticorpo comprende una sequenza di regione variabile di catena pesante avente un'identità di sequenza di amminoacidi di almeno 95% con SEQ ID NO:37, e una sequenza di regione variabile di catena leggera  
5 avente un'identità di sequenza di amminoacidi di almeno 95% con SEQ ID NO:43.
2. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene della rivendicazione 1, comprendente una sequenza di regione variabile di catena pesante avente un'identità di sequenza di amminoacidi di almeno 98% con SEQ ID NO:37, e una sequenza di regione variabile di catena leggera avente un'identità di sequenza di amminoacidi di almeno 98% con SEQ ID NO:43.
- 10 3. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene della rivendicazione 1, comprendente sequenze di regione variabile di catena pesante e leggera come rispettivamente riportate in SEQ ID NO:37 e SEQ ID NO:43.
4. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che inibisce il legame di LAG-3 alle molecole di istocompatibilità maggiore (MHC) di classe II.
5. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che stimola una  
15 risposta a cellule T antigene-specifica.
6. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene della rivendicazione 5, in cui l'anticorpo stimola la produzione di interleuchina-2 da parte della cellula T antigene-specifica.
7. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che si lega alla proteina LAG-3 umana con una  $K_D$  di  $1 \times 10^{-9}$  M o meno.
- 20 8. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che si lega alla proteina LAG-3 umana con una  $K_D$  di  $5 \times 10^{-10}$  M o meno.
9. Composizione comprendente l'anticorpo o la sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, e un trasportatore farmaceuticamente accettabile.
- 25 10. Composizione della rivendicazione 9, comprendente inoltre almeno un anticorpo immunostimolante addizionale.



11. Composizione della rivendicazione 10, in cui l'anticorpo immunostimolante è un anticorpo anti-PD-1, un anticorpo anti-PD-L1 e/o un anticorpo anti-CTLA-4.
12. Composizione della rivendicazione 10, in cui l'anticorpo immunostimolante è un anticorpo anti-PD-1.
13. Immunoconiugato comprendente l'anticorpo o la sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle  
5 rivendicazioni 1 - 8, collegato/a ad un agente terapeutico.
14. Molecola di acido nucleico isolata codificante per l'anticorpo o per la sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 8.
15. Vettore di espressione comprendente la molecola di acido nucleico della rivendicazione 14.
16. Cellula ospite comprendente il vettore di espressione della rivendicazione 15.
- 10 17. Metodo per preparare un anticorpo anti-CTLA-4, che prevede di esprimere l'anticorpo nella cellula ospite della rivendicazione 16 e di isolare l'anticorpo dalla cellula ospite.
18. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 7, o composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 9 - 12, da usare in terapia.
- 15 19. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 8, e almeno un anticorpo immunostimolante addizionale, da usare in terapia.
- 20 20. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene e almeno un anticorpo immunostimolante addizionale della rivendicazione 19 per l'uso della rivendicazione 19, in cui l'anticorpo immunostimolante è un anticorpo anti-PD-1, un anticorpo anti-PD-L1 e/o un anticorpo anti-CTLA-4.
21. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene e almeno un anticorpo immunostimolante addizionale della rivendicazione 19 per l'uso della rivendicazione 19, in cui l'anticorpo immunostimolante è un anticorpo anti-PD-1.
22. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene e almeno un anticorpo immunostimolante addizionale di una qualsiasi delle rivendicazioni 19-21 per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 19-21, in cui l'anticorpo o la sua porzione legante l'antigene e l'almeno un anticorpo immunostimolante addizionale vengono somministrati simultaneamente, separatamente o sequenzialmente.



23. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 8, o composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 9 - 12, da usare per stimolare una risposta a cellule T antigene-specifica.

24. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 8, o composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 9 - 12, da usare per stimolare una risposta immunitaria in un soggetto.

5 25. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 8, o composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 9 - 12, da usare per inibire la crescita di cellule tumorali in un soggetto.

26. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 8, o composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 9 - 12, da usare per trattare un'infezione virale in un soggetto.

10

Il sottoscritto dichiara che la presente  
traduzione è conforme al testo originale.

15

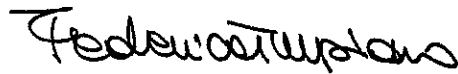




TAVOLA I

**Anti-LAG3 25F7 VH**

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 1A



TAVOLA II

Anti-LAG3 25F7 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK2

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 1B

TAVOLA III

**Anti-LAG3 26H10 VH**

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

```

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

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

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

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

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

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

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

**FIGURA 2A**



TAVOLA IV

Anti- LAG3 26H10 VK

segmento V: A27  
 segmento J: JK3

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 2B



TAVOLA V

**Anti-LAG3 25E3 VH**

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

```

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

                                CDR 1
                                -----
      R L S C A A S G F T P D D Y G M S W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG AGC TGG

                                CDR 2
                                -----
      V R Q A P G K G L E W V S G I N W N
109 GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCT GGT ATT AAT TGG AAT

                                CDR 2
                                -----
      G G S T Y Y A D S V K G R F T I S G
163 GGT GGT AGC ACA TAT TAT GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC GGA

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

                                CDR 3
                                -----
      T A L Y Y C T T G G Y W G Q G T L V
271 ACG GCC TTG TAT TAC TGT ACC ACT GGG GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC

      T V S S
325 ACC GTC TCC TCA
    
```

**FIGURA 3A**

TAVOLA VI

**Anti-LAG3 25E3 VK**

segmento V: L18  
 segmento J: JK2

```

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

                                CDR 1
      -----
      V T I T C R A S Q G I R S A L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGG AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR 2
      -----
      Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR 2
      -----
      E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR 3
      -----
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR 3
      -----
      F N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
271 TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 3B

TAVOLA VII

Anti-LAG3 8B7 VH

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

```

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

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

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

                                CDR2
                                -----
      G N T N C N P S L K S R V T I S G D
163 GGA AAC ACC AAC TGC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GGA GAT

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

                                CDR3
                                -----
      A V Y Y C A R G Y D I L T G Y Y E D
271 GCT GTC TAT TAC TGT GCG AGA GGA TAC GAT ATT TTG ACT GGT TAT TAT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      S W G P G T L V T V S S
325 TCC TGG GGC CCG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 4A

TAVOLA VIII

**Anti-LAG3 8B7 VK**

segmento V: L6  
 segmento J: JK4

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 4B

TAVOLA IX

Anti- IAG3 11F2 VH

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

```

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

                                CDR 1
-----
A S V K V S C K V S G Y T L T E V S
55 GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA GTA TCC

CDR 1                                CDR 2
-----
M H W V R Q A P G K G L E W M G G F
109 ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGT TTT

                                CDR 2
-----
D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T
163 GAT CCT GAA GRT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC

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

                                CDR 3
-----
S E D T A V Y Y C A T A F V V V V A
271 TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA ACA GCC TTT GTA GTG GTG GTA GCT

                                CDR 3
-----
A S D Y W G Q G T L V T V S S
325 GCT TCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 5A

TAVOLA X

Anti-LAG3 11F2 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 5B

TAVOLA XI

Anti-LAG3 17E5 VH

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

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

CDR 1

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

CDR 2

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

CDR 2

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

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

CDR 3

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

CDR 3

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

FIGURA 6A

TAVOLA XII

Anti-LAG3 17B5 VK

segmento V: L6  
 segmento J: JK5

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 6B

TAVOLA XIII

Anti-IAG3 25F7 VH

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

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

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

JH5b linea germ. P W G Q G T L V T V S S  
25F7 VH - - - - - (JH5b)

FIGURA 7

TAVOLA XIV

Anti-IAG3 25F7 VK

I6 linea germ. E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S  
 25F7 VK ----- CDR1 ----- I - -

I6 linea germ. Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F  
 25F7 VK ----- CDR2 ----- - - -

I6 linea germ. S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q R S N  
 25F7 VK ----- CDR3 ----- - - -

I6 linea germ. W P  
 JK2 linea germ. T F G Q G T K L E I K  
 25F7 VK ----- N - - - - (JK2)

FIGURA 8



TAVOLA XV

Anti-IAG3 26H10 VH

3-33 linea germ. 26H10 VH	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S <sup>CDR1</sup> S Y G M H W
3-33 linea germ. 26H10 VH	V R Q A P G K G L E W V A V I W <sup>CDR2</sup> Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
3-33 linea germ. JH6b linea germ. 26H10 VH	D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R <sup>CDR3</sup> Y G
JH6b linea germ. 26H10 VH	M D V W G Q G I T V I V S S

FIGURA 9

TAVOLA XVI

Anti-LAG3 26H10 VK

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

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

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

FIGURA 10

TAVOLA XVII

Anti-IAG3 25E3 VH

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

CDR1

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

CDR2

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

CDR 3

JH4b linea germ. T V S S  
25E3 VH (JH4B)

FIGURA 11

TAVOLA XVIII

Anti-LAG3 25E3 VK

L18 linea germ. A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S  
 25E3 VK1 ----- CDR 1 ----- R -

L18 linea germ. A I A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F  
 25E3 VK1 ----- CDR 2 -----

L18 linea germ. S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S  
 25E3 VK1 ----- CDR 3 -----

L18 linea germ. Y P  
 JK2 linea germ. Y T F G Q G T K L E I K (JK2)

FIGURA 12



TAVOLA XIX

Anti-IAG3 8E7 VH

4-34 linea germ. 8E7 VH	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S <u>CDR1</u> G Y Y W S W
4-34 linea germ. 8E7 VH	I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D <u>CDR2</u> R N C
4-34 linea germ. JH5b linea germ. 8E7 VH	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R G <u>CDR3</u>
JH5b linea germ. 8E7 VH	P W G Q G T L V T V S S S P

FIGURA 13

TAVOLA XX

Anti-LAG3 8B7 VK

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

FIGURA 14





TAVOLA XXII

Anti-LAG3 11F2 VK

L6 linea germ.  
11F2.6 VK

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S  
CDR1

L6 linea germ.  
11F2.6 VK

Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F  
CDR2

L6 linea germ.  
11F2.6 VK

S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N  
CDR3

L6 linea germ.  
JK1 linea germ.  
11F2.6 VK

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

FIGURA 16



TAVOLA XXIV

Anti-LAG3 17E5 VK

L6 linea germ. 17E5 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
L6 linea germ. 17E5 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
L6 linea germ. 17E5 VK	S G S C S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N
L6 linea germ. JK5 linea germ. 17E5 VK	W P I T F G Q G T R L E I K

FIGURA 18



TAVOLA XXVI

			450
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(401)	QEAQLLSQFWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSTGSAQSRGRAPGALRAGHL	
Clone a cdna pa23-5	(401)	QEAQLLSQFWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSTGSAQSRGRAPGALRAGHL	500
			451
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(451)	ELFLILGVLELLLVITGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE	
Clone a cdna pa23-5	(451)	ELFLILGVLELLLVITGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE	
		Dominio transmembrana	
			501
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(501)	ELEQFELEPELELERELGPEPEPGPEPEPEQL-	534
Clone a cdna pa23-5	(501)	ELEQFELEPELELERELGPEPEPGPEPEPEQL-	

FIGURA 19 - segue