

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N° 3472207

Depositato il 20.06.17

A nome: F-Star Delta Limited

di nazionalità: britannica

a: EDDEVA B920 Babraham Research Campus

Cambridge, Cambridgeshire CB22 3AT/GB

dal titolo: Molecole leganti che legano Pd-L1 e Lag-3

DESCRIZIONE

Domande correlate

Il presente caso riguarda US 62/352482 depositato il 20 giugno 2016.

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda molecole anticorpali che si legano
5 al ligando di morte programmata 1 (PD-L1) e al gene di attivazione dei
linfociti 3 (LAG-3). Le molecole anticorpali comprendono un sito legante
l'antigene basato su CDR per PD-L1 e un sito legante l'antigene LAG-3
che è situato in due o più anse strutturali di un dominio CH3 della
molecola anticorpale. Le molecole anticorpali dell'invenzione trovano
0 applicazione, ad esempio, nella terapia contro il cancro.

Background dell'invenzione

Il gene 3 di attivazione dei linfociti (LAG-3; CD223) è un membro
della superfamiglia delle Ig ed è geneticamente e strutturalmente
correlato a CD4 (sebbene con solo il 20% di identità di sequenza). Come
5 CD4, LAG-3 si lega a molecole MHC di classe II ma con affinità superiore
rispetto a CD4 ($K_D = 60$ nM). LAG-3 è espresso su cellule T attivate,
cellule NK, pDC, cellule B, cellule $\gamma\delta$ T e partecipa alla soppressione

a

immunitaria, in particolare attraverso una forte espressione persistente in una percentuale di cellule T regolatorie (Treg) (Liang et al, 2008).

Il gene LAG-3 è situato sul cromosoma umano 12, adiacente al gene CD4, e annovera 8 esoni. Esistono cinque trascritti alternativi, due dei quali generano prodotti proteici: una proteina transmembrana di lunghezza intera e una forma monomerica solubile sottoposta a splicing in modo alternativo. Il trascritto di lunghezza intera codifica per una proteina di 525 amminoacidi con un peso molecolare di 70 kDa e ha attività funzionale, mentre la forma solubile sembra non legare le molecole MHC di classe II e la sua funzione è sconosciuta. La proteina LAG-3 umana di lunghezza intera ha un'identità di sequenza del 93% con LAG-3 di *Macaca fascicularis* (macaco cinomolgo) e un'identità di sequenza del 70% con LAG-3 di *Mus musculus* (topo domestico).

LAG-3 è una proteina transmembrana con quattro domini Ig-simili extracellulari (D1-D4), e una porzione citoplasmatica responsabile della segnalazione di LAG-3. Il dominio citoplasmatico ha un motivo EP (acido glutammico/prolina) che si associa alla proteina associata a LAG-3 (LAP) nonché un motivo KIEELE ritenuto necessario per la modulazione di LAG-3 della funzione delle cellule T. Rapporti sul ruolo del motivo EP suggeriscono che esso può essere responsabile del traffico di LAG-3 alla membrana superficiale delle cellule T (Bae et al, 2014), o può essere direttamente responsabile della modulazione della segnalazione a valle di STAT5 durante l'attivazione delle cellule T (Durham et al, 2014), o possibilmente entrambi.

Si ritiene che il meccanismo immunosoppressivo di LAG-3 sulle cellule T sia guidato dalla reticolazione di LAG-3 sulle cellule T

attivate che ha come risultato la diminuzione del flusso di calcio e del rilascio di IL-2 durante l'attivazione delle cellule T (Huard et al, 1997). Sulle cellule presentanti l'antigene (APC), il legame alle molecole MHC II da parte di cellule T regolatorie LAG-3 positive causa una diminuzione della secrezione di IL-12 e una sottoregolazione di CD86 (Liang et al, 2008), un "segnale secondario" di attivazione, avendo come risultato l'anergia delle cellule T da attivazione impropria e/o ridotta presentazione dell'antigene da parte delle APC. I modelli di topi knock out LAG-3 sono vitali, con solo una lieve linfoiperproliferazione (Workman et al, 2003), indicando che LAG-3 agisce come un modesto "freno" immunitario.

È stato altresì proposto che questa interazione soppressiva tra LAG-3 e MHC di classe II si verifichi tra Treg e cellule T CD4 positive (Sega et al, 2014). Le Treg sopprimono la risposta immunitaria mediante rilascio di citochine soppressive (come IL-10 e TGF β), manipolazione del metabolismo infiammatorio (come adenosina catabolizzata da CD73), regolazione della maturazione di APC o interazione diretta tra cellule T regolatorie e cellule T effettrici. Esistono prove nell'uomo che le Treg MHC di classe II positive sono più soppressive delle Treg MHC di classe II negative (Baecher-Allen et al, 2006) e sopprimono attivamente la risposta immunitaria attraverso l'interazione diretta con LAG-3 espressa sulle cellule T effettrici. Mentre le cellule Treg LAG-3 negative possono sopprimere la proliferazione delle cellule T convenzionali, le cellule T CD4 e CD8 LAG-3 negative sono resistenti alla soppressione immunitaria delle Treg. È stato descritto che questo processo si verifica tra le cellule T umane attraverso un processo noto

al

come trogocitosi (Sega et al, 2014) per cui le Treg non solo impediscono la maturazione di APC, ma acquisiscono anche MHC di classe II per sopprimere le cellule T CD4 LAG-3 positive sottoposte a priming.

L'espressione di LAG-3 è anche un marker di stimolazione antigenica ripetuta. Nel cancro, le cellule T adottano comunemente un fenotipo "esausto", che comporta l'espressione di immunosoppressori come PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3 (Wherry et al, 2011), in cui le cellule hanno un'incapacità generale di proliferare e secernere correttamente le chemochine in risposta all'antigene. L'inibizione di questi immunosoppressori abbassa la soglia immunitaria e (ri)consente una corretta risposta contro il cancro da parte delle cellule T. Nei modelli preclinici, ciò è stato dimostrato usando anticorpi antagonisti contro LAG-3, CTLA-4 e PD-1 in cui è stata osservata una diminuzione del carico tumorale. Si ritiene che l'inibizione di LAG-3 da parte di anticorpi antagonisti riattivi la risposta immunitaria nel microambiente tumorale, dove l'espressione di LAG-3 su cellule T CD4 positive e cellule T CD8 positive è associata a un fenotipo esausto, e l'espressione di LAG-3 su Treg è associata a potenti capacità immunosoppressive. Gli anticorpi che bloccano LAG-3 aumentano la proliferazione delle cellule T effettrici, la produzione di citochine, la citotossicità e diminuiscono l'attività soppressiva dei Treg portando a una diminuzione della crescita tumorale.

Nei tumori umani, è stata trovata un'espressione aumentata di LAG-3 sui linfociti infiltranti il tumore (TIL) da carcinomi di cellule renali umane e altri tumori, come melanomi e linfomi (Demeure et al, 2001; Wolchock et al, 2013). In modo importante LAG-3 è anche strettamente correlato alla disfunzione delle cellule T in pazienti con

infezione virale cronica (Workman et al, 2005) e cancro (Workman et al, 2003). LAG-3 è stato anche identificato come marker di superficie per Treg infiltranti il tumore in una varietà di cancro umani (Camisachi et al. 2010; Gandhi et al, 2006).

5 Gli anticorpi monoclonali per LAG-3 umano sono in fase di sviluppo clinico per abrogare la soppressione immunitaria e potenzialmente potenziare la presentazione dell'antigene nei cancro (tumori maligni solidi ed ematologici).

LAG-525 e IMP-701 (Novartis AG) sono anticorpi umani contro LAG-3
0 e sono avanzati a studi clinici rispettivamente in fase II e I nel cancro del rene (cancro a cellule renali); cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC); cancro nasofaringeo; cancro colorettaie; melanoma; cancro gastrico e adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea.

L'anticorpo anti-LAG-3 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb Company),
5 è attualmente sottoposto a test clinici in fase I per il cancro ovarico; NSCLC; Cancro colorettaie; Cancro cervicale; Melanoma; Cancro gastrico; Cancro della vescica; Cancro della testa e del collo, Carcinoma a cellule squamose; Carcinoma a cellule renali e in studi in fase II in NSCLC; Leucemia linfatica cronica recidivante (CLL); Leucemia linfatica cronica
0 refrattaria (CLL); Melanoma; Linfoma non-Hodgkin; Linfoma di Hodgkin; Linfoma diffuso a grandi cellule B; Linfoma indolente; Linfoma a cellule mantellari; Mieloma multiplo refrattario; e Mieloma multiplo recidivante come monoterapia o come parte di terapie di combinazione.

Ulteriori anticorpi contro LAG-3 sono anche in fase di sviluppo
5 preclinico.

La morte cellulare programmata 1 (PD-1) e i suoi ligandi PD-L1

(CD274, B7-H1) e PD-L2 (B7-DC) erogano segnali inibitori che regolano l'equilibrio tra attivazione, tolleranza e immunopatologia delle cellule T. PD-L1 viene espresso transitoriamente su tutte le cellule immunitarie e su alcune cellule tumorali.

5 PD-L1 è una proteina transmembrana di tipo I con due domini Ig-
simili all'interno della regione extracellulare, un dominio
transmembrana e un dominio citoplasmatico corto. Il dominio
citoplasmatico non ha un motivo di trasduzione del segnale noto
suggerendo che non vi è alcuna segnalazione da parte di PD-L1
0 sull'interazione del ligando con il suo recettore. Il suo peso molecolare
è di 40 kDa (290 amminoacidi) ed è codificato dal gene CD274
rispettivamente sul cromosoma murino 19 e sul cromosoma umano 9. PD-L1
è un membro della famiglia delle proteine B7 e condivide
approssimativamente il 20% di identità di sequenza amminoacidica con
5 B7.1 e B7.2. PD-L1 umano condivide un'identità amminoacidica del 70% e
del 93% con gli ortologhi rispettivamente murini e di cinomolgo di PD-
L1.

PD-L1 si lega al suo recettore PD-1 con un'affinità (K_D) di 770 nM.
PD-1 è espresso su cellule T attivate, cellule B e cellule mieloidi e
0 modula l'attivazione o l'inibizione delle risposte immunitarie
cellulari. Il legame di PD-L1 a PD-1 eroga un segnale inibitorio,
riducendo la produzione di citochine e la proliferazione delle cellule
T. Di conseguenza, l'espressione di PD-L1 da parte delle cellule può
mediare la protezione contro l'uccisione di linfociti T citotossici (CTL)
5 ed è un meccanismo di regolazione che smorza le risposte immunitarie
croniche durante le infezioni virali. Il cancro, come una malattia

Di

cronica e proinfiammatoria sovverte questa via immunitaria protettiva attraverso la sovraregolazione dell'espressione di PD-L1 per eludere la risposta immunitaria dell'ospite. Nel contesto di una risposta immunitaria attiva, anche IFN γ sovraregola l'espressione di PD-L1.

5 PD-L1 media anche la soppressione immunitaria attraverso l'interazione con un'altra proteina, B7.1 (nota anche come CD80), bloccando la sua capacità di erogare uno dei segnali secondari di attivazione sulle cellule T attraverso CD28. In termini di espressione di PD-L1 sulle cellule tumorali e del suo impegno con B7.1, la rilevanza
0 di questa interazione specifica nella resistenza immunitaria tumorale non è ancora chiara.

L'espressione di PD-L1 è stata mostrata in un'ampia varietà di tumori solidi. Dei 654 campioni esaminati in uno studio, che annoverano 19 tumori provenienti da siti diversi, 89 (14%) erano PD-L1 positivi
5 (frequenza $\geq 5\%$). Le frequenze di PD-L1 positivi più elevate sono state osservate in testa e collo (17/54; 31%), cancro cervicale (10/34; 29%), cancro di origine primaria sconosciuta (CUP; 8/29; 28%), glioblastoma multiforme (GBM; 5/20; 25%), vescica (8/37; 21%), esofageo (16/80; 20%),
0 mammella triplo negativo (TN) (6/33; 18%) ed epatocarcinoma (6/41; 15%) (Grosso et al, 2013). È stato mostrato che l'espressione associata al tumore di PD-L1 conferisce resistenza immunitaria e potenzialmente protegge le cellule tumorali dall'apoptosi mediata dalle cellule T.

Le terapie che bersagliano PD-L1 hanno mostrato ottimi risultati negli studi murini *in vivo*. Nel modello murino B16 di melanoma, il
5 trattamento con anti-PD-L1 combinato con strategie di vaccinazione GVAX o FVAX ha avuto come risultato un effetto significativo sia sulla

sopravvivenza (30 giorni per il controllo rispetto a 52 giorni per il trattamento con PD-L1) sia sulla percentuale di animali privi di tumore (5%) al termine dello studio (Curran et al, 2010). Per studiare il meccanismo di immunosoppressione nel modello di mastoma murino P815 è stata anche usata una terapia con anti-PD-L1. Le cellule P815 iniettate nei topi innescano normalmente una forte risposta immunitaria, che ha come risultato il loro rigetto. Quando PD-L1 è espresso su cellule P815, queste cellule sfuggono all'attacco immunitario, che a sua volta può essere negato attraverso la somministrazione di anticorpi anti-PD-L1 (Iwai et al, 2002). È evidente che bersagliare l'asse PD-1/PD-L1 nei tumori umani immunogenici (Herbst et al, 2014) ha come risultato un vantaggio di sopravvivenza attraverso la stimolazione di una risposta immunitaria anti-cancro (Wolchock et al, 2013; Larkin et al, 2015).

Atezolizumab (MPDL3280A, RG7466, TECENTRIQ) è un anticorpo IgG1 umanizzato che lega PD-L1. È in studi clinici come agente singolo e anche in combinazione con altre terapie biologiche e/o con piccole molecole per il trattamento di tumori solidi, inclusi cancro coloretale, cancro della mammella, carcinoma polmonare non a piccole cellule, cancro della vescica e carcinoma a cellule renali. Il trattamento con atezolizumab ha come risultato tassi di risposta oggettiva (ORR) del 23% in NSCLC, 36% melanoma, 33% vescica, 14% in RCC e 13% nei tumori di testa e del collo (Herbst et al, 2014; Powles et al, 2014).

Avelumab (MSB0010718C) è un anticorpo IgG1 completamente umano che si lega a PD-L1 ed è sottoposto a test clinici in una serie di tumori inclusi cancro della vescica, cancro gastrico, cancro della testa e del collo, mesotelioma, carcinoma polmonare non a piccole cellule, cancro

dl-

ovarico, cancro renale e carcinoma a cellule di Merkel.

Durvalumab (MEDI4736) è un anticorpo IgG1 umano che si lega a PD-L1 ed è testato in fase di sperimentazione clinica da solo o in combinazione con tremelimumab nel cancro polmonare non a piccole cellule, carcinoma a cellule squamose della testa e del collo, cancro della vescica, cancro pancreatico e con altre molecole biologiche e piccole in sperimentazioni per ulteriori cancri solidi come cancri gastrici, melanoma e carcinoma epatocellulare non resecabile.

Ulteriori anticorpi anti-PD-L1 sono stati testati in sperimentazioni cliniche, che includono BMS-936559 e altri sono sottoposti a test preclinici.

Tuttavia, poche terapie anti-LAG-3 sono attualmente sottoposte a test clinici e nessuna è stata approvata per la terapia, quindi rimane la necessità di sviluppare molecole aggiuntive che abbiano come bersaglio LAG-3. Sebbene vi siano alcuni agenti terapeutici anti-PD-L1 in fase di sviluppo, i dati attuali mostrano che il trattamento complessivo con monoterapia con anti-PD-L1 ha come risultato una risposta in meno del 50% dei pazienti oncologici. Pertanto, rimane la necessità nella tecnica di molecole aggiuntive che possono bersagliare LAG-3 e/o PD-L1 e che trovano applicazione nella terapia contro il cancro.

Dichiarazioni dell'invenzione

Gli anticorpi anti-PD-1 e anti-PD-L1 sono prevalentemente coinvolti nella rottura della tolleranza immunitaria e nell'attivazione di una risposta immunitaria anti-tumorale. LAG-3, espresso sulle cellule T dopo attivazione, e costitutivamente espresso sulle cellule T esauste, mantiene ulteriormente queste cellule in uno stato soppressivo. Il blocco

di LAG-3, quando impiegato in combinazione con altre molecole immunosoppressive consolidate (ad esempio: PD-1, PD-L1) ha altresì mostrato di fornire una risposta immunitaria sinergica migliorata nei modelli tumorali murini (Woo et al, 2012). I presenti inventori hanno postulato che le terapie che bersagliano simultaneamente entrambe queste vie affronteranno direttamente i meccanismi che promuovono e mantengono l'esaurimento delle cellule T. Inoltre, gli inventori prevedono che bersagliare LAG-3 possa sopprimere la presentazione dell'antigene attraverso l'azione di cellule T regolatorie che esprimono LAG-3 sulle APC e la ricerca pubblicata che documenta la sottoregolazione di CD86 (Grosso et al, 2013). Si prevede che blocco di questa interazione mantenga la presentazione dell'antigene, mentre si prevede che il blocco della segnalazione di PD-L1 interrompa la tolleranza, avendo come risultato una significativa risposta anti-tumorale quando entrambe le vie sono inibite allo stesso tempo.

I dati pubblicati sulle combinazioni di anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-L1 sono limitati sebbene vi siano alcuni risultati da modelli preclinici di tumore murino singenico e modelli di carica virale. In un modello murino di mieloma, una combinazione di anticorpi bloccanti anti-PD-L1 e anti-LAG-3 è stata somministrata a seguito di una bassa dose di irradiazione su tutto il corpo e di tassi di sopravvivenza migliorati superiori all'80% (Jing et al, 2015; WO2015/048312). Non è stata osservata alcuna evidenza di autoimmunità sistemica o organo-specifica. Topi knock-out LAG-3 e PD-1 hanno mostrato un marcato aumento della sopravvivenza e della clearance di molteplici tumori trapiantabili (Woo et al, 2012).

I presenti inventori hanno postulato che anticorpi bispecifici che si legano sia a LAG-3 sia a PD-L1 conferirebbero una serie di vantaggi rispetto alla combinazione di anticorpi monoclonali contro questi antigeni, inclusi:

5 **1. Terapia diretta**

Le cellule T attivate esprimono LAG-3 nei linfonodi. Una parte dell'anticorpo bispecifico anti-LAG-3/PD-L1 bersaglia le cellule T LAG-3-positivo sottoposte a priming nel linfonodo, che poi si dirigono verso il sito del tumore, trasportando l'anticorpo bispecifico. Una volta all'interno del microambiente tumorale, le cellule T che trasportano l'anticorpo bispecifico sono in grado di impegnare e bloccare immediatamente PD-L1 sulle cellule tumorali attraverso la porzione di anti-PD-L1. Di conseguenza, tutte le cellule T che viaggiano verso il sito tumorale sono resistenti sia alla segnalazione di LAG-3 sia di PD-L1/PD-1.

5 **2. Ponte**

Le cellule T CD8 positive sottoposte a priming incontrano antigeni tumorali all'interno del microambiente tumorale, dove rispondono uccidendo la cellula tumorale in assenza di segnali soppressivi. Si prevede che gli anticorpi bispecifici siano superiori rispetto alle combinazioni di singole terapie monoclonali mantenendo o prolungando questo contatto tra cellule T e cellule tumorali. La forza del segnale nell'attivazione delle cellule T è essenziale, il che, nel caso dell'antigene presentato nei cancri, può essere fondamentale (Engels et al, 2013) e si prevede che la presenza di un anticorpo bispecifico anti-LAG-3/PD-L1 legato a bersagli su APC o cellule cancerose aumenti il

tempo in cui le cellule T possono riconoscere con successo l'antigene e attivarsi.

3. Localizzazione

Nelle aree di infiammazione e nelle risposte immunitarie in corso, l'espressione di PD-L1 è significativamente aumentata a causa del rilascio localizzato di IFN- γ . Ciò è vero su cellule cancerose bersaglio, macrofagi associati al tumore (TAM) o stimolazione ripetuta delle popolazioni di cellule T. Si prevede che un anticorpo bispecifico che antagonizza PD-L1 e LAG-3 si localizzi e si concentri nelle aree di massima espressione di PD-L1 nel tumore, consentendo al contempo alla porzione anti-LAG-3 di legarsi e impedire la soppressione mediata da LAG-3 delle cellule T.

Dopo un ampio programma di screening e maturazione di affinità, i presenti inventori sono stati in grado di identificare dieci membri di legame specifici comprendenti un sito di legame specifico per LAG-3 nel dominio CH3 della molecola. Queste molecole hanno mostrato di avere un'alta affinità per LAG-3 sia umano sia di cinomolgo. Si prevede che l'elevata affinità per LAG-3 umano sia vantaggiosa nel trattamento, ad esempio, di cancri contenenti linfociti infiltranti il tumore (TIL) che esprimono LAG-3 in pazienti umani, mentre si prevede che l'elevata affinità per LAG-3 di cinomolgo, che è paragonabile all'affinità per LAG-3 umano, sia utile nella valutazione delle proprietà degli specifici membri di legame nei modelli di malattia del macaco cinomolgo. La ragione di ciò è che i risultati ottenuti sono più probabilmente predittivi degli effetti del membro di legame specifico nei pazienti umani rispetto a quando una molecola che ha una variabilità più elevata nella sua

affinità per LAG-3 umano e di cinomolgo viene testata in modelli di macaco cinomolgo.

È stato anche dimostrato che i membri di legame specifici hanno un'elevata attività in un saggio di attivazione delle cellule T, che si prevede sia predittivo di un'efficacia migliorata nei pazienti umani attraverso un'inibizione potenziata di LAG-3.

I presenti inventori hanno inoltre combinato questi elementi di legame specifici comprendenti un sito di legame specifico per LAG-3 nel dominio CH3 con un dominio Fab anticorpale comprendente un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 per creare molecole di anticorpi bispecifici comprendenti siti di legame sia per LAG-3 sia per PD-L1, che si prevede abbiano i vantaggi sopra descritti nel dettaglio. Versioni murine surrogate di queste molecole anticorpali che si legano a LAG-3 murino e a PD-L1 murino sono state altresì preparate dagli inventori e hanno mostrato di essere in grado di inibire significativamente la crescita tumorale in modelli murini singenici di cancro. In particolare, l'uso di queste molecole murine surrogate ha dimostrato che vi è un effetto sinergico sulla soppressione della crescita tumorale quando una molecola anticorpale comprendente siti di legame sia per LAG-3 sia per PD-L1 viene somministrata ai topi nei modelli murini testati. Sulla base del meccanismo d'azione simile di LAG-3 e PD-L1 umani e murini nell'ambiente tumorale, si prevede che gli studi murini che mostrano efficacia nel diminuire il carico tumorale si traducano in benefici terapeutici clinici nei pazienti umani affetti da cancro. Sulla base di questi risultati, si prevede pertanto che le molecole anticorpali dell'invenzione mostreranno un effetto superiore nel trattamento del

cancro in pazienti umani, in particolare nella soppressione della crescita tumorale, rispetto, ad esempio, alla somministrazione di due molecole separate che legano rispettivamente LAG-3 e PD-L1.

Pertanto, la presente invenzione fornisce una molecola anticorpale che si lega al ligando di morte programmata 1 (PD-L1) e al gene di attivazione dei linfociti 3 (LAG-3), in cui la molecola anticorpale comprende:

- (i) un sito legante l'antigene basato sulla regione determinante la complementarità (CDR) per PD-L1 comprendente le CDR esposte in SEQ ID NO da 86 a 91; e
- (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio CH3 della molecola anticorpale, in cui il sito legante LAG-3 comprende le sequenze amminoacidiche WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) e PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3), e in cui la sequenza amminoacidica WDEPWGED è situata nell'ansa AB del dominio CH3 e la sequenza amminoacidica PYDRWVWPDE è situata nell'ansa EF del dominio CH3.

La sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 1 è preferibilmente situata in corrispondenza dei residui da 11 a 18 del dominio CH3; e/o la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 3 è situata in corrispondenza dei residui da 92 a 101 del dominio CH3; in cui la numerazione dei residui amminoacidici è conforme allo schema di numerazione IMGT ImMunoGeneTics.

Il sito legante l'antigene LAG-3 della molecola anticorpale può inoltre comprendere una delle seguenti sequenze, preferibilmente nell'ansa CD del dominio CH3 della molecola anticorpale:

- (i) SNGQPENNY (SEQ ID NO 2, 8 e 18);

- (ii) SNGQPEDNY (SEQ ID NO: 13);
- (iii) SNGYPEIEF (SEQ ID NO: 23);
- (iv) SNGIPEWNY (SEQ ID NO: 28);
- (v) SNGYAEYNY (SEQ ID NO: 33);
- 5 (vi) SNGYKEENY (SEQ ID NO: 38);
- (vii) SNGVPELNV (SEQ ID NO: 43); o
- (viii) SNGYQEDNY (SEQ ID NO: 48).

Preferibilmente, il sito legante l'antigene LAG-3 della molecola anticorpale comprende inoltre una delle seguenti sequenze, preferibilmente nell'ansa CD del dominio CH3 della molecola anticorpale: la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2, 28 o 38 nell'ansa CD del dominio CH3. Più preferibilmente, il sito legante l'antigene LAG-3 della molecola anticorpale comprende inoltre la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2 nell'ansa CD del dominio CH3

5 La sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 o 48 è preferibilmente situata in corrispondenza dei residui da 43 a 78 del dominio CH3 della molecola anticorpale, in cui i residui sono numerati secondo lo schema di numerazione IMGT.

La sequenza del dominio CH3 della molecola anticorpale, diversa dalle sequenze del sito legante l'antigene LAG-3, non è particolarmente limitata. Preferibilmente, il dominio CH3 è un dominio di immunoglobuline G umane, come un dominio CH3 di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umana, in modo maggiormente preferibile un dominio CH3 di IgG1 umana. Le sequenze dei domini CH3 di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umane sono note nella tecnica.

5 In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale comprende il dominio CH3 esposto nella SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30,

35, 40, 45 o 50, più preferibilmente il dominio CH3 esposto in SEQ ID NO: 5, 30 o 40, in modo maggiormente preferibile il dominio CH3 esposto in SEQ ID NO: 5. In alternativa, la molecola anticorpale può comprendere un dominio CH3 con una sequenza amminoacidica che ha identità di sequenza
5 almeno del 70%, almeno del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferibilmente SEQ ID NO: 5, 30, o 40, più preferibilmente SEQ ID NO: 5.

0 La molecola anticorpale può inoltre comprendere un dominio CH2. Il dominio CH2 è preferibilmente situato in corrispondenza della terminazione N del dominio CH3, come nel caso di una molecola di IgG umana. Il dominio CH2 della molecola anticorpale è preferibilmente il dominio CH2 della IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umana, più preferibilmente il
5 dominio CH2 della IgG1 umana. Le sequenze dei domini di IgG umane sono note nella tecnica. In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale comprende un dominio CH2 di IgG con la sequenza esposta in SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, o un dominio CH2 con una sequenza amminoacidica che ha identità di sequenza almeno del 70%, almeno del
0 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale comprende la sequenza esposta in SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12, 16, 17, 21,
5 22, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 41, 42, 46, 47, 51 o 52, o una sequenza che ha identità di sequenza almeno del 70%, almeno del 75%, almeno dell'80%,

almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con la sequenza esposta in SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 41, 42, 46, 47, 51, o 52. Più preferibilmente, la molecola anticorpale comprende la sequenza esposta in SEQ ID NO: 6, 7, 31, 32, 41 o 42, o una sequenza che ha un'identità di sequenza almeno del 70%, almeno del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con la sequenza esposta nella SEQ ID NO: 6, 7, 31, 32, 41, o 42. Ancora più preferibilmente, la molecola anticorpale comprende la sequenza esposta in SEQ ID NO: 6 o 7, o una sequenza che ha un'identità di sequenza almeno del 70%, almeno del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con la sequenza esposta nella SEQ ID NO: 6 o 7.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale è una molecola di immunoglobuline G umane, come una molecola di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umana, più preferibilmente una molecola di IgG1 umana. Le sequenze delle molecole di immunoglobuline G umane sono note nella tecnica e introdurre un dominio CH3 o una sequenza di dominio CH3 come descritto nella presente in una tale molecola non presenta alcuna difficoltà per l'esperto.

La molecola anticorpale comprende tutte e sei le regioni determinanti la complementarità esposte in SEQ ID NO da 86 a 91. Preferibilmente, la molecola anticorpale comprende i domini VH e/o VL esposti rispettivamente in SEQ ID NO 92 e 93.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale

comprende la sequenza di catena pesante esposta in una qualsiasi delle
SEQ ID NO: da 94 a 113, o una catena pesante con una sequenza
amminoacidica che ha identità di sequenza almeno del 70%, almeno del
75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%,
5 almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con una
qualsiasi delle SEQ ID NO: da 94 a 113, a condizione che il dominio VH
della sequenza della catena pesante rimanga invariato. Più
preferibilmente, la molecola anticorpale comprende la sequenza di catena
pesante esposta in una qualsiasi delle SEQ ID NO: 94, 95, 104, 105, 108
0 e 109, o una catena pesante con una sequenza amminoacidica che ha
identità di sequenza almeno del 70%, almeno del 75%, almeno dell'80%,
almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno
del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con una qualsiasi delle SEQ ID
NO: 94, 95, 104, 105, 108 e 109, a condizione che il dominio VH della
5 sequenza della catena pesante rimanga invariato. Ancora più
preferibilmente, la molecola anticorpale comprende la sequenza di catena
pesante esposta in SEQ ID NO: 94 o 95, o una catena pesante con una
sequenza amminoacidica che ha identità di sequenza almeno del 70%, almeno
del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del
0 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con
SEQ ID NO: 94 o 95, a condizione che il dominio VH della sequenza della
catena pesante rimanga invariato.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la molecola
anticorpale può inoltre, o in alternativa, comprendere la sequenza di
5 catena leggera esposta in SEQ ID NO: 116, o una catena leggera con una
sequenza amminoacidica che ha un'identità di sequenza almeno del 70%,

almeno del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98% o almeno del 99% con SEQ ID NO: 116, a condizione che il dominio VL della sequenza di catena leggera rimanga invariato.

5 La molecola anticorpale è preferibilmente in grado di legarsi simultaneamente a PD-L1 e LAG-3. Ad esempio, PD-L1 e LAG-3 possono essere presenti su due cellule diverse. Senza voler essere limitati dalla teoria, si ritiene che ciò abbia come risultato una reticolazione tra cellule e internalizzazione di PD-L1 e/o LAG-3 che le rende non
0 disponibili per la stimolazione.

I presenti inventori hanno mostrato che una molecola anticorpale comprendente (i) un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1; e (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio CH3 della molecola anticorpale, in conformità con la presente invenzione, FS18-7-
5 9/84G09, ha sorprendentemente mediato la citotossicità dipendente dal complemento (CDC) di cellule che esprimono PD-L1 ma non di cellule che esprimono LAG-3, anche quando una miscela di cellule che esprimono LAG-3 e PD-L1 era presente nel campione. Si prevede che questa proprietà sia
0 utile laddove, come nel caso di FS18-7-9/84G09, il legame dell'antigene basato su CDR della molecola anticorpale bersagli una cellula tumorale e il sito di legame situato in un dominio costante della molecola anticorpale bersagli una cellula immunitaria, poiché la cellula immunitaria può essere protetta da CDC mediata dal legame alla molecola anticorpale, mentre le cellule tumorali sono soggette a CDC.

5 Pertanto, viene anche descritta una molecola anticorpale che si lega all'antigene tumorale e un antigene delle cellule immunitarie, in

cui la molecola anticorpale comprende:

(i) un sito legante l'antigene basato su CDR per un antigene tumorale;
e

5 (ii) un sito legante l'antigene per un antigene di cellule immunitarie
situato in un dominio costante, preferibilmente un dominio CH3 o
CH2, più preferibilmente un dominio CH3, della molecola
anticorpale,

in cui la molecola anticorpale non media, o non media
significativamente, la citotossicità dipendente dal complemento di una
0 cellula immunitaria comprendente detto antigene di cellula immunitaria
quando detta cellula immunitaria è legata dalla molecola anticorpale.

La molecola anticorpale può inoltre mediare la citotossicità
dipendente dal complemento di una cellula tumorale comprendente detto
antigene tumorale quando detta cellula tumorale è legata dalla molecola
5 anticorpale.

I metodi per misurare la CDC di una molecola anticorpale sono noti
nella tecnica e sono descritti nella presente.

I presenti inventori hanno inoltre mostrato che una molecola
anticorpale comprendente (i) un sito legante l'antigene basato su CDR
0 per PD-L1; e (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio
CH3 della molecola anticorpale, in conformità con la presente invenzione,
FS18-7-9/84G09, ha sorprendentemente mediato una bassa citotossicità
cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) di cellule che esprimono LAG-3
rispetto ad ADCC di cellule che esprimono PD-L1. Si prevede nuovamente
5 che questa proprietà sia utile laddove, come nel caso di FS18-7-9/84G09,
il legame dell'antigene basato su CDR della molecola anticorpale

bersaglia una cellula tumorale e il sito di legame situato in un dominio costante della molecola anticorpale bersaglia una cellula immunitaria, poiché la cellula immunitaria può essere sottoposta ad ADCC inferiore rispetto a una cellula tumorale legata dall'anticorpo.

5 Come spiegato nella presente, nella tecnica sono note mutazioni per ridurre o abrogare l'attività di ADCC delle molecole anticorpali. Una di tali mutazioni è la mutazione LALA descritta nella presente. È stato inaspettatamente scoperto che FS18-7-9/84G09 ha una bassa attività di ADCC verso le cellule che esprimono LAG-3. Laddove non sia necessario
0 abrogare completamente l'attività di ADCC, ciò può rappresentare un vantaggio.

Pertanto, viene anche descritta una molecola anticorpale che si lega all'antigene tumorale e un antigene delle cellule immunitarie, in cui la molecola anticorpale comprende:

- 5 (i) un sito legante l'antigene basato su CDR per un antigene tumorale;
e
(ii) un sito legante l'antigene per un antigene di cellule immunitarie
situato in un dominio costante, preferibilmente un dominio CH3 o
CH2, più preferibilmente un dominio CH3, della molecola
0 anticorpale,

in cui la molecola anticorpale causa meno ADCC rispetto alle cellule immunitarie comprendenti detto antigene di cellule immunitarie quando dette cellule immunitarie sono legate dalla molecola anticorpale rispetto alle cellule tumorali comprendenti detto antigene tumorale
5 quando dette cellule tumorali sono legate dalla molecola anticorpale. La molecola anticorpale può non mediare, o non mediare

significativamente, ADCC di una cellula immunitaria comprendente detto antigene di cellula immunitaria quando detta cellula immunitaria è legata dalla molecola anticorpale. La molecola anticorpale può inoltre non mediare, o non mediare significativamente, la citotossicità dipendente dal complemento di una cellula immunitaria comprendente detto antigene di cellule immunitarie quando detta cellula immunitaria è legata dalla molecola anticorpale e/o può mediare la citotossicità dipendente dal complemento di una cellula tumorale comprendente detto antigene tumorale quando detta cellula tumorale è legata dalla molecola anticorpale.

I metodi per misurare la ADCC di una molecola anticorpale sono noti nella tecnica e sono descritti nella presente.

Nella tecnica sono noti vari antigeni tumorali e antigeni delle cellule immunitarie. L'antigene tumorale e l'antigene delle cellule immunitarie possono essere antigeni di superficie cellulare. L'antigene delle cellule immunitarie può essere un antigene presente sui linfociti infiltranti il tumore.

Il sito legante l'antigene per l'antigene delle cellule immunitarie può comprendere una o più modificazioni in una o più anse strutturali del dominio costante della molecola anticorpale, come l'ansa AB, CD e/o EF del dominio costante. Ad esempio, il sito di legame può essere un sito legante LAG-3 come descritto nella presente.

La molecola anticorpale dell'invenzione può essere coniugata con un modulatore del sistema immunitario, una molecola citotossica, un radioisotopo o un marcatore rilevabile. Il modulatore del sistema immunitario o molecola citotossica può essere una citochina.

La presente invenzione fornisce anche un acido nucleico codificante

per una molecola anticorpale dell'invenzione, nonché un vettore comprendente un tale acido nucleico.

Viene anche fornita una cellula ospite ricombinante comprendente un acido nucleico o il vettore dell'invenzione. Una tale cellula ospite ricombinante può essere usata per produrre una molecola anticorpale. Pertanto, viene anche fornito un metodo per produrre una molecola anticorpale dell'invenzione, il metodo comprendendo la coltivazione della cellula ospite ricombinante in condizioni per la produzione della molecola anticorpale. Il metodo può ulteriormente comprendere una fase di isolare e/o purificare la molecola anticorpale.

Si prevede che le molecole anticorpali della presente invenzione trovino applicazione in applicazioni terapeutiche, in particolare applicazioni terapeutiche negli esseri umani, come il trattamento contro il cancro. Pertanto, viene anche fornita una composizione farmaceutica comprendente una molecola anticorpale secondo l'invenzione e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

La presente invenzione fornisce anche una molecola anticorpale dell'invenzione per uso in un metodo per trattare il cancro in un paziente. Viene inoltre fornito l'uso di una molecola anticorpale secondo l'invenzione nella fabbricazione di un medicinale per il trattamento del cancro in un paziente. Il trattamento può inoltre comprendere la somministrazione al paziente di un vaccino antitumorale e/o di un agente chemioterapico.

Breve descrizione delle figure

Figura 1: A mostra un allineamento di sequenza dei nove Fcab identificati seguendo la seconda maturazione di affinità,

FS18-7-32; FS18-7-33; FS18-7-36; FS18-7-58; FS18-7-62; FS18-7-65; FS18-7-78; FS18-7-88; e FS18-7-95, contro il Fcab progenitore, FS18-7-9. **B** mostra l'identità di sequenza percentuale di ciascuno di questi Fcab con la sequenza di Fcab progenitore, FS18-7-9.

La **Figura 2** mostra i risultati di un saggio di attivazione delle cellule T. Nello specifico, la Figura 2 mostra grafici rappresentativi del rilascio di IL-2, che è indicativo dell'attivazione delle cellule T, nel pannello di linee cellulari trattate con mAb² FS18-7-9/84G09 (**Figura 2A-C**), o FS18-7-62/84G09 o FS18-7-78/84G09 (**Figura 2D-F**), e anticorpi di controllo. **Figura 2A:** Il saggio con LAG-3 e PD-L1 ha richiesto l'inibizione di entrambi i bersagli (FS18-7-9/84G09LALA, FS18-7-9/4420LALA+84G09, 25F7+84G09LALA o 25F7+S1LALA) per avere l'attivazione. **Figura 2B:** Il saggio con LAG-3 ha richiesto solo l'inibizione di LAG-3 per l'attivazione (FS18-7-9/84G09LALA, FS18-7-9/4420LALA+84G09, 25F7+84G09LALA, 25F7+S1LALA, 25F7, FS18-7-9/4420 LALA). **Figura 2C:** Il saggio con PD-L1 ha richiesto solo l'inibizione di PD-L1 per l'attivazione (FS18-7-9/84G09LALA, FS18-7-9/4420LALA+84G09, 25F7+84G09LALA, 25F7+S1LALA, 84G09LALA). **Figura 2D:** Il saggio con LAG-3 e PD-L1 ha richiesto l'inibizione di entrambi i bersagli (FS18-7-62/84G09LALA, FS18-7-78/84G09LALA, FS18-7-62/4420LALA+84G09, FS18-7-78/4420LALA+84G09, 25F7+84G09LALA o 25F7+S1LALA) per avere l'attivazione. **Figura E:** Il saggio con solo LAG-3 ha

richiesto l'inibizione di LAG-3 per l'attivazione (FS18-7-62/84G09LALA, FS18-7-62/4420LALA, FS18-7-78/84G09LALA, FS18-7-78/4420LALA, FS18-7-62/4420LALA+84G09, FS18-7-78/4420LALA+84G09, 25F7+84G09LALA o 25F7+S1LALA). **Figura 2F:**

5 Il saggio con solo PD-L1 ha richiesto l'inibizione di PD-L1 per l'attivazione (FS18-7-62/84G09LALA, FS18-7-78/84G09LALA, FS18-7-62/4420LALA+84G09, FS18-7-78/4420LALA+84G09, 25F7+84G09LALA o 25F7+S1LALA).

0 La **Figura 3** mostra che FS18-7-9/84G09 è stato in grado di indurre l'attivazione delle cellule T, come indicato dal rilascio di IL-2, in presenza sia di cLAG-3 + cPD-L1 sia di cLAG-3 o cPD-L1 da solo, mostrando una reattività funzionalmente crociata di cinomolgo.

5 La **Figura 4** mostra un grafico rappresentativo del saggio SEB. Il mAb² contro LAG-3/PD-L1 e la combinazione del mAb² LAG-3/4420 + 84G09LALA hanno mostrato una maggiore attivazione rispetto al mAb 84G09LALA da solo, mentre il mAb² LAG-3/4420 o il mAb 4420 non hanno mostrato un'attivazione significativa.

0 La **Figura 5** mostra i pesi del tumore terminale al giorno 20 nel modello di tumore singenico MC38 non insediato. I topi trattati con mAb² contro LAG-3/PD-L1 (FS18-29/S1) avevano tumori terminali con pesi significativamente inferiori rispetto a quelli trattati con una combinazione di mAb di riferimento, C9B7W e S1.

5 La **Figura 6** mostra le curve di crescita del modello di tumore singenico MC38 non insediato. I topi trattati con mAb² contro

LAG-3/PD-L1 (FS18-29/S1) avevano tumori inferiori rispetto a quelli trattati con una combinazione di mAb di riferimento, C9B7W e S1, o quelli trattati con S1 da solo. Il mAb² LAG-3/4420 e il mAb anti-LAG-3 di riferimento hanno avuto un

5
La **Figura 7** mostra i pesi del tumore terminale al giorno 24 nel modello di tumore singenico MC38 insediato. Il mAb² contro LAG-3/PD-L1 (FS18-29/S1) è stato efficace nel sopprimere la crescita tumorale come la combinazione di anticorpi di
0 riferimento, C9B7W e S1. FS18-29/4420 da solo non ha avuto alcun impatto evidente sulla crescita tumorale e S1 e C9B7W hanno entrambi avuto un effetto lieve sulla crescita tumorale risultante.

5
La **Figura 8** mostra le curve di crescita tumorale del modello di tumore singenico MC38 insediato. I topi trattati con mAb² contro LAG-3/PD-L1 (FS18-29/S1) avevano volumi di tumori simili a quelli trattati con una combinazione di mAb di riferimento, C9B7W e S1. I topi trattati con S1 o C9B7W da soli hanno mostrato volumi tumorali intermedi, mentre il trattamento
0 con mAb² LAG-3/4420 non ha avuto alcun impatto sulla crescita tumorale.

5
La **Figura 9** mostra i pesi del tumore terminale al giorno 20 nel modello di tumore singenico CT26 non insediato. Il mAb² contro LAG-3/PD-L1 (FS18-29/S1 e FS18-35/S1) ha soppresso la crescita tumorale in misura maggiore rispetto alla
5 combinazione di anticorpi di riferimento, C9B7W e S1.

La **Figura 10** mostra le curve di crescita tumorale del modello di tumore singenico CT26 non insediato. Vi era una differenza statisticamente significativa dimostrata in FS18-35/S1 rispetto al controllo con IgG nella soppressione della crescita tumorale. Una tale differenza statisticamente significativa non è stata osservata con la combinazione di anticorpi di riferimento rispetto al gruppo di controllo con IgG.

La **Figura 11** mostra i pesi del tumore terminale al giorno 22 nel modello di tumore singenico MC38 non insediato usato per confrontare l'effetto della mutazione LALA nel mAb² sull'inibizione della crescita tumorale. Non vi sono state differenze statisticamente significative nel peso del tumore terminale tra topi trattati con mAb² con e senza la mutazione LALA.

La **Figura 12** mostra le curve di crescita tumorale del modello di tumore singenico MC38 non insediato usato per confrontare l'effetto del mAb² con e senza la mutazione LALA sull'inibizione della crescita tumorale. Non vi è stata alcuna differenza statisticamente significativa nelle curve di crescita tumorale tra topi trattati con mAb² con e senza la mutazione LALA, tuttavia vi è stata una tendenza verso un'inibizione della crescita tumorale aumentata da parte di molecole contenenti la mutazione LALA.

La **Figura 13** mostra l'effetto del trattamento con mAb² sull'espressione di LAG-3 delle cellule T. L'espressione di

LAG-3 su linfociti infiltranti il tumore (TIL) CD8 **(A)**, CD4 **(B)** e FoxP3 **(C)** trattati con mAb² FS18-29/S1, FS18-29/4420, S1, FS18-29/4420 e S1, o anticorpo di controllo 4420 viene mostrata ai giorni 19 e 23 dopo l'inoculazione del tumore, corrispondenti rispettivamente ai giorni 3 e 7 dopo l'ultimo dosaggio di mAb²/anticorpo. L'espressione di LAG-3 è diminuita dopo il trattamento con mAb² FS18-29/S1 ai giorni 19 e 23. Anche gli animali a cui è stata somministrata una combinazione di FS18-29/4420 e S1 hanno mostrato una diminuzione dell'espressione di LAG-3, ma l'effetto è stato ritardato fino al giorno 23, mentre FS18-29/4420 o S1 somministrati singolarmente hanno avuto come risultato una diminuzione ridotta o nulla dell'espressione di LAG-3a.

La **Figura 14** mostra la percentuale di lisi delle cellule Raji esprimenti PD-L1 e LAG-3 dopo vari trattamenti con anticorpo/mAb² usando un saggio di CDC di rilascio di lattato deidrogenasi (LDH). **A** e **B** mostrano lisi mediata da CDC delle cellule Raji esprimenti rispettivamente PD-L1 e LAG-3. Le cellule sono state incubate con anticorpo anti-LAG-3 25F7, anticorpo anti-PD-L1 84G09, anticorpo anti-PD-L1 84G09 comprendente la mutazione LALA, anticorpo anti-CD20 Rituximab, mAb² FS18-7-9/84G09, mAb² FS18-7-9/84G09 comprendente la mutazione LALA, o Rituximab comprendente la mutazione LALA. Il rilascio di LDH è stato misurato 4 ore dopo il trattamento con il complemento di coniglio neonato ed espresso come percentuale rispetto alla lisi totale. La

concentrazione del trattamento con anticorpo/mAb² è indicata sull'asse X. È stato impostato un valore condiviso per le pendenze di tutte le curve al fine di poterle confrontare tra loro.

5 La **Figura 15** mostra la percentuale di cellule Raji esprimenti PD-L1 e LAG-3 morte dopo vari trattamenti usando un saggio di CDC basato sulla citometria a flusso. Una miscela di cellule esprimenti PD-L1 e LAG-3 marcate con fluorescenza in modo differenziale è stata incubata con l'anticorpo di controllo 4420, l'anticorpo anti-CD20 Rituximab (RIT), una
0 combinazione di anticorpo anti-LAG-3 25F7 e anticorpo anti-PD-L1 84G09, o mAb² FS18-7-9/84G09. Le cellule sono state poi trattate con il complemento di coniglio neonato e colorate usando un colorante che colorava solo le cellule
5 morte. La percentuale di cellule morte nelle due popolazioni cellulari è stata valutata come percentuale di cellule totali. Il tipo cellulare (che esprime PD-L1 o che esprime LAG-3, identificato dai marcatori fluorescenti differenziali) valutato dopo ciascun trattamento è indicato
0 nella **Figura 15** dopo il nome del trattamento pertinente, si veda ad esempio 4420 PDL1, che si riferisce alla valutazione della vitalità delle cellule Raji che esprimono PD-L1 dopo il trattamento con anticorpo di controllo 4420. La concentrazione del trattamento con anticorpo/mAb² è indicata
5 sull'asse X

La **Figura 16** mostra la percentuale di lisi (citotossicità) delle

cellule Raji esprimenti PD-L1 e LAG-3 dopo vari trattamenti
usando un saggio di ADCC di rilascio di lattato deidrogenasi
(LDH). Le cellule sono state trattate con anticorpo anti-
CD20 Rituximab, anticorpo anti-PD-L1 84G09, mAb² FS18-7-
9/84G09, Rituximab comprendente la mutazione LALA, mAb² FS18-
7-9/84G09 comprendente la mutazione LALA, anticorpo anti-
LAG-3 25F7, anticorpo anti-PD-L1 84G09 comprendente la
mutazione LALA, anticorpo di controllo 4420, o anticorpo di
controllo 4420 comprendente la mutazione LALA. Le cellule
trattate sono state poi co-incubate con cellule NK primarie
e il rilascio di LDH specifico è stato misurato come
percentuale rispetto alla lisi totale delle cellule
bersaglio. La concentrazione del trattamento con
anticorpo/mAb² è indicata sull'asse X.

5 Descrizione dettagliata

La presente invenzione riguarda molecole anticorpali che si legano
sia a PD-L1 sia a LAG-3. Nello specifico, le molecole anticorpali della
presente invenzione comprendono un sito legante l'antigene basato su CDR
per PD-L1 e un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio
costante della molecola anticorpale come esposto nelle rivendicazioni.
I termini "PD-L1" e "LAG-3" possono riferirsi a PD-L1 umano e LAG-3
umano, PD-L1 murino e LAG-3 murino e/o PD-L1 di macaco cinomolgo e LAG-
3 di macaco cinomolgo, a meno che il contesto non richieda altrimenti.
Preferibilmente i termini "PD-L1" e "LAG-3" si riferiscono a PD-L1 umano
e LAG-3 umano, a meno che il contesto non richieda altrimenti.

Il termine "molecola anticorpale" descrive un'immunoglobulina

naturale o parzialmente o totalmente prodotta sinteticamente. La molecola anticorpale può essere umana o umanizzata. La molecola anticorpale è preferibilmente una molecola anticorpale monoclonale. Esempi di anticorpi sono gli isotipi di immunoglobulina, come l'immunoglobulina G, e le loro sottoclassi isotipiche, come IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, nonché loro frammenti.

Come usato nella presente, il termine "molecola anticorpale" include quindi frammenti anticorpali, a condizione che detti frammenti comprendano un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 e un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio costante, come un dominio CH1, CH2 o CH3, preferibilmente un dominio CH3, della molecola anticorpale. A meno che il contesto non richieda diversamente, il termine "molecola anticorpale", come usato nella presente, è quindi equivalente a "molecola anticorpale o suo frammento".

È possibile assumere anticorpi monoclonali e altri anticorpi e usare tecniche di tecnologia del DNA ricombinante per produrre altri anticorpi o molecole chimeriche che mantengono la specificità dell'anticorpo originale. Tali tecniche possono comportare l'introduzione delle CDR, o regioni variabili, e/o delle sequenze di dominio costante che forniscono il sito legante l'antigene LAG-3, in un'immunoglobulina diversa. L'introduzione delle CDR di un'immunoglobulina in un'altra immunoglobulina è descritta ad esempio in EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Tecniche simili possono essere impiegate per le sequenze di dominio costante rilevanti. In alternativa, un ibridoma o altra cellula che produce una molecola anticorpale può essere soggetto/a a mutazione genetica o ad altri cambiamenti, che possono o meno alterare la

specificità di legame degli anticorpi prodotti.

Poiché gli anticorpi possono essere modificati in vari modi, il termine "molecola anticorpale" deve essere interpretato coprendo frammenti anticorpali, derivati, equivalenti funzionali e omologhi di anticorpi, incluso qualsiasi polipeptide comprendente un dominio di legame dell'immunoglobulina, sia essa naturale o interamente o parzialmente sintetica. Sono quindi incluse molecole chimeriche comprendenti un dominio legante l'immunoglobulina, o equivalente, fuso con un altro polipeptide. Clonaggio ed espressione di anticorpi chimerici sono descritti in EP-A- 0120694 e EP-A-0125023.

Un esempio di frammento anticorpale comprendente sia sequenze CDR sia dominio CH3 è un minibody, che comprende un scFv unito a un dominio CH3 (Hu et al. (1996), Cancer Res., 56(13):3055-61).

La molecola anticorpale della presente invenzione si lega a PD-L1 e LAG-3. Il legame in questo contesto può riferirsi a un legame specifico. Il termine "specifico" può riferirsi alla situazione in cui la molecola anticorpale non mostrerà alcun legame significativo a molecole diverse dall'uno o più suoi partner di legame specifici, qui PD-L1 e LAG-3. Il termine "specifico" è applicabile anche laddove la molecola anticorpale è specifica per particolari epitopi, come epitopi su PD-L1 e LAG-3, che sono trasportati da un certo numero di antigeni, nel qual caso la molecola anticorpale sarà in grado di legarsi ai vari antigeni che trasportano l'epitopo.

LAG-3 condivide un'identità di sequenza del 40% con CD4, la sua proteina più strettamente correlata. I presenti inventori hanno testato il Fcab FS18-7-9, che comprende le sequenze amminoacidiche esposte in

SEQ ID NO da 1 a 3, per il legame a CD4. Fcab FS18-7-9 non ha mostrato alcun legame con CD4, dimostrando che questa molecola lega specificamente LAG-3. Pertanto, in una forma di realizzazione preferita, il sito legante LAG-3 di una molecola anticorpale della presente invenzione non si lega, o non mostra alcun legame significativo, a CD4.

Una molecola anticorpale dell'invenzione comprende un sito legante l'antigene LAG-3. Il sito legante l'antigene LAG-3 è situato in un dominio CH3. Il sito legante LAG-3 comprende le sequenze amminoacidiche WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) e PYDRVWPDE. (SEQ ID NO: 3). Queste sequenze erano presenti in tutti i principali cloni di Fcab anti-LAG-3 identificati dai presenti inventori a seguito di un ampio programma di screening e caratterizzazione come descritto negli esempi.

Le sequenze amminoacidiche esposte in SEQ ID NO 1 e 2 sono situate in anse strutturali del dominio CH3 della molecola anticorpale. L'introduzione di sequenze nelle regioni di ansa strutturale di domini costanti anticorpali per creare nuovi siti leganti l'antigene è descritta, ad esempio, in WO2006/072620 e WO2009/132876.

Le anse strutturali dei domini costanti dell'anticorpo includono le anse AB, CD e EF. Nel dominio CH3, le anse AB, CD e EF sono situate in corrispondenza dei residui 11-18, 43-78 e 92-101 del dominio CH3, dove la numerazione dei residui amminoacidici è conforme allo schema di numerazione ImmunoGeneTics (IMGT). La sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 1 è situata nell'ansa AB del dominio CH3. La sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 3 è situata nell'ansa EF del dominio CH3. Più preferibilmente, la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 1 è situata in corrispondenza dei residui da 11 a 18 del dominio

CH3; e/o la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 3 è situata in corrispondenza dei residui da 92 a 101 del dominio CH3, in cui la numerazione dei residui amminoacidici è secondo lo schema di numerazione IMGT.

5 In aggiunta, la molecola anticorpale comprende preferibilmente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 o 48, più preferibilmente SEQ ID NO: 2, 28 o 38, ancora più preferibilmente SEQ ID NO: 2, in un'ansa strutturale di un dominio CH3 della molecola anticorpale. L'ansa strutturale è preferibilmente l'ansa
0 CD. La sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 o 48 è preferibilmente situata in corrispondenza dei residui da 43 a 78 del dominio CH3, in cui la numerazione dei residui amminoacidici è secondo lo schema di numerazione IMGT.

Una molecola anticorpale dell'invenzione può inoltre comprendere
5 un residuo di acido glutammico (E) in corrispondenza della posizione 36 e/o un residuo di tirosina (Y) in corrispondenza della posizione 85.2 del dominio CH3 (come mostrato nella Figura 1A), in cui la numerazione dei residui amminoacidici è secondo lo schema di numerazione IMGT. In particolare, una molecola anticorpale che comprende la regione ad ansa
0 strutturale CD esposta in SEQ ID NO: 8 comprende inoltre preferibilmente un residuo di acido glutammico (E) in corrispondenza della posizione 36 del dominio CH3. Analogamente, una molecola anticorpale che comprende la regione ad ansa strutturale CD esposta in SEQ ID NO: 18 comprende inoltre preferibilmente un residuo di tirosina (Y) in corrispondenza
5 della posizione 85.2 del dominio CH3.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale

dell'invenzione comprende un dominio CH3 che comprende, ha o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferibilmente un dominio CH3 con la sequenza esposta in SEQ ID NO: 5, 30, o 40, più preferibilmente, un dominio CH3 con la sequenza esposta in SEQ ID NO: 5.

La molecola anticorpale dell'invenzione può comprendere un dominio CH3 che comprende, ha o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, in cui la sequenza del dominio CH3 comprende inoltre un residuo di lisina (K) in corrispondenza dell'immediato terminale C della sequenza mostrata in SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50. Pertanto, ad esempio, la molecola anticorpale dell'invenzione può comprendere un dominio CH3 che comprende, ha o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 5 con un residuo di lisina in corrispondenza del terminale C della sequenza mostrata in SEQ ID NO: 5. La sequenza di un tale dominio CH3 sarebbe quindi la seguente:

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 135)

Inoltre, la molecola anticorpale dell'invenzione può comprendere un dominio CH2 di una molecola di immunoglobulina G, come un dominio CH2 di una molecola di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferibilmente la molecola anticorpale dell'invenzione comprende un dominio CH2 di una molecola IgG1. Il dominio CH2 può avere la sequenza esposta in SEQ ID NO: 53.

Il dominio CH2 della molecola anticorpale può comprendere una mutazione per ridurre o abrogare il legame del dominio CH2 a uno o più recettori Fcγ, come FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII e/o al complemento.

I domini CH2 dei domini di IgG umana normalmente si legano ai recettori Fcγ e al complemento e gli inventori postulano che un legame ridotto ai recettori Fcγ ridurrà la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e un legame ridotto al complemento ridurrà l'attività della citotossicità dipendente dal complemento (CDC) della molecola anticorpale. Le mutazioni per ridurre o abrogare il legame del dominio CH2 con uno o più recettori Fcγ e complemento sono note e includono la "mutazione LALA" descritta in Bruhns, et al. (2009) e Xu et al. (2000). Pertanto, la molecola anticorpale può comprendere un dominio CH2, in cui il dominio CH2 comprende residui di alanina in corrispondenza delle posizioni 4 e 5 del dominio CH2, in cui la numerazione è conforme allo schema di numerazione IMGT. Ad esempio, la molecola anticorpale comprende un dominio CH2 di IgG1 che comprende, ha o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 54.

La molecola anticorpale della presente invenzione comprende un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1, come esposto nella Rivendicazione 1. L'espressione "sito legante l'antigene basato su CDR" si riferisce al sito legante l'antigene di una regione variabile della molecola anticorpale che è composta da sei CDR. La preparazione di molecole anticorpali contro PD-L1 e la determinazione delle sequenze CDR di tali molecole anticorpali rientrano ampiamente nelle capacità dell'esperto e molte tecniche adatte sono note nella tecnica.

La molecola anticorpale dell'invenzione comprende la HCDR3 dell'anticorpo 84G09. È noto che la HCDR3 svolge un ruolo nel determinare la specificità di una molecola anticorpale (Segal et al., (1974), PNAS, 71:4298-4302; Amit et al., (1986), Science, 233:747-753; Chothia et al.,

(1987), J. Mol. Biol., 196:901-917; Chothia et al., (1989), Nature, 342:877-883; Caton et al., (1990), J. Immunol., 144:1965-1968; Sharon et al., (1990a), PNAS, 87:4814-4817; Sharon et al., (1990b), J. Immunol., 144:4863-4869; Kabat et al., (1991b), J. Immunol., 147:1709-1719).

5 La molecola anticorpale comprende inoltre la HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dell'anticorpo 84G09. L'esperto del settore non avrebbe difficoltà nel determinare le sequenze delle CDR dalle sequenze di dominio VH e VL dell'anticorpo 84G09 mostrate rispettivamente in SEQ ID NO 92 e 93. Le sequenze CDR possono ad esempio essere determinate secondo
0 Kabat (Kabat, E.A. et al., (1991)) o lo schema di numerazione IMGT.

Le sequenze della HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dell'anticorpo 84G09, secondo lo schema di numerazione IMGT, sono esposte rispettivamente in SEQ ID NO 86, 87, 88, 89, 90 e 91.

5 Le sequenze della HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dell'anticorpo 84G09, secondo Kabat, sono esposte rispettivamente in SEQ ID NO 136, 137, 138, 139, 140 e 141.

L'anticorpo può anche comprendere il dominio VH e/o VL dell'anticorpo 84G09. Le sequenze di dominio VH e VL dell'anticorpo 84G09 sono mostrate rispettivamente in SEQ ID NO 92 e 93.

0 In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale dell'invenzione comprende (i) un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 comprendente le sequenze HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dell'anticorpo 84G09, e (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio CH3 della molecola anticorpale, in cui il sito
5 legante LAG-3 comprende le sequenze amminoacidiche esposte nelle SEQ ID NO 1 e 3, e una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito

da: SEQ ID NO 2, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43 e 48, come esposto nelle rivendicazioni.

5 Più preferibilmente, la molecola anticorpale dell'invenzione comprende (i) un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 comprendente le sequenze HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dell'anticorpo 84G09, e (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio CH3 della molecola anticorpale, in cui il sito legante LAG-3 comprende le sequenze amminoacidiche esposte nelle SEQ ID NO 1 e 3, e una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da:
0 SEQ ID NO 2, 28 e 38, come esposto nelle rivendicazioni.

Ancora più preferibilmente, la molecola anticorpale dell'invenzione comprende (i) un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 comprendente le sequenze HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dell'anticorpo 84G09, e (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato
5 in un dominio CH3 della molecola anticorpale, in cui il sito legante LAG-3 comprende le sequenze amminoacidiche esposte nelle SEQ ID NO 1, 2 e 3, come esposto nelle rivendicazioni.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale dell'invenzione comprende un dominio VH e un dominio VL che comprendono,
0 hanno o sono costituiti dalla sequenza esposta rispettivamente nelle SEQ ID NO 92 e 93, e un dominio CH3 che comprende, ha o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferibilmente un CH3 che comprende, ha o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 5, 30, o 40, più preferibilmente, un dominio CH3
5 che comprende, ha, o è costituito dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 5.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale comprende una catena pesante che comprende, ha o è costituita dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: da 94 a 113 e una catena leggera che comprende, ha o è costituita dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 116. Più preferibilmente, la molecola anticorpale comprende una catena pesante che comprende, ha o è costituita dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 94, 95, 104, 105, 108 e 109 e una catena leggera che comprende, ha o è costituita dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 116. Con preferenza assoluta, la molecola anticorpale comprende una catena pesante che comprende, ha o è costituita dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 94 o 95 e una catena leggera che comprende, ha, o è costituita dalla sequenza esposta in SEQ ID NO: 116.

Le molecole anticorpali descritte nella presente possono anche comprendere varianti dell'ansa strutturale, del dominio CH3, del dominio CH2, del dominio CH2 e del dominio CH3, delle sequenze di catena leggera o di catena pesante descritte nella presente, a condizione che i domini VL e VH delle sequenze rispettivamente di catena leggera e di catena pesante rimangano invariati. Varianti adatte possono essere ottenute per mezzo di metodi di alterazione della sequenza, o mutazione, e screening. In un aspetto preferito, una molecola anticorpale comprendente una o più sequenze varianti mantiene una o più delle caratteristiche funzionali della molecola anticorpale progenitrice, come la specificità di legame e/o l'affinità di legame per LAG-3 e PD-L1. Ad esempio, una molecola anticorpale comprendente una o più sequenze varianti si lega preferibilmente a LAG-3 e/o PD-L1 con la stessa affinità, o un'affinità superiore, rispetto alla molecola anticorpale (progenitrice). La

molecola anticorpale progenitrice è una molecola anticorpale che non comprende la/le sostituzione/i, delezione/i e/o inserzione/i amminoacidiche che sono state incorporate nella molecola anticorpale variante.

5 Ad esempio, una molecola anticorpale può comprendere una sequenza di ansa strutturale, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 e CH3, sequenza di catena leggera o catena pesante che ha un'identità di sequenza almeno del 70%, almeno del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'85%, almeno del 90%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 0 97%, almeno del 98%, almeno del 99%, almeno del 99,1%, almeno del 99,2%, almeno del 99,3%, almeno del 99,4%, almeno del 99,5%, almeno del 99,6%, almeno del 99,7%, almeno del 99,8% o almeno del 99,9% con una sequenza di ansa strutturale, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 e CH3, catena leggera o catena pesante descritti nella presente, a condizione che i 5 domini VL e VH delle sequenze rispettivamente di catena leggera e pesante rimangano invariati.

La molecola anticorpale può comprendere una sequenza di dominio CH3 che ha identità di sequenza almeno del 97%, almeno del 98%, almeno del 99%, almeno del 99,1%, almeno del 99,2%, almeno del 99,3%, almeno del 0 99,4%, almeno del 99,5%, almeno del 99,6%, almeno del 99,7%, almeno del 99,8% o almeno del 99,9% con la sequenza di dominio CH3 esposta nella SEQ ID NO: 4, 5, o 135.

In alternativa, la molecola anticorpale comprende una sequenza di dominio CH3 e CH2, che ha un'identità di sequenza almeno del 97%, almeno 5 del 98%, almeno del 99%, almeno del 99,1%, almeno del 99,2%, almeno del 99,3%, almeno del 99,4%, almeno del 99,5%, almeno del 99,6%, almeno del

99,7%, almeno del 99,8% o almeno del 99,9% con la sequenza di dominio CH2 e CH3 esposta nella SEQ ID NO: 6 o 7.

L'identità di sequenza viene comunemente definita facendo riferimento all'algoritmo GAP (pacchetto Wisconsin GCG, Accelrys Inc, San Diego USA). GAP usa l'algoritmo di Needleman e Wunsch per allineare due sequenze complete che massimizzano il numero di corrispondenze e riducono al minimo il numero di gap. Generalmente, vengono usati i parametri predefiniti, con una penalità di creazione di gap = 12 e una penalità di estensione di gap = 4. L'uso di GAP può essere preferito, ma è possibile usare altri algoritmi, ad esempio BLAST (che usa il metodo di Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (che usa il metodo di Pearson e Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o l'algoritmo di Smith-Waterman (Smith e Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o il programma TBLASTN, di Altschul et al. (1990) supra, impiegando generalmente i parametri predefiniti. In particolare, l'algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402).

Una molecola anticorpale può anche comprendere una sequenza di ansa strutturale, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 e CH3, catena leggera o catena pesante che ha una o più alterazioni della sequenza amminoacidica (addizione, delezione, sostituzione e/o inserzione di un residuo amminoacidico), preferibilmente 20 alterazioni o meno, 15 alterazioni o meno, 10 alterazioni o meno, 5 alterazioni o meno, 4 alterazioni o meno, 3 alterazioni o meno, 2 alterazioni o meno, o 1 alterazione rispetto a una sequenza di ansa strutturale, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 e dominio CH3, catena leggera o catena pesante descritti nella presente, a condizione che i domini VL e VH delle



sequenze rispettivamente di catena leggera e pesante rimangano invariati. In particolare, possono essere realizzate alterazioni in una o più regioni cornice della molecola anticorpale al di fuori delle sequenze di dominio VH e VL.

5 Ad esempio, la molecola anticorpale può comprendere una sequenza di dominio CH3 con una o più alterazioni della sequenza amminoacidica (addizione, delezione, sostituzione e/o inserzione di un residuo amminoacidico), preferibilmente 20 alterazioni o meno, 15 alterazioni o meno, 10 alterazioni o meno, 5 alterazioni o meno, 4 alterazioni o meno, 0 3 alterazioni o meno, 2 alterazioni o meno, o 1 alterazione rispetto alla sequenza di dominio CH3 esposta in SEQ ID NO: 4, 5, o 135.

In alternativa, la molecola anticorpale comprende una sequenza di dominio CH3 e CH2, una o più alterazioni della sequenza amminoacidica (addizione, delezione, sostituzione e/o inserzione di un residuo amminoacidico), preferibilmente 20 alterazioni o meno, 15 alterazioni o meno, 10 alterazioni o meno, 5 alterazioni o meno, 4 alterazioni o meno, 5 3 alterazioni o meno, 2 alterazioni o meno, o 1 alterazione rispetto alla sequenza di dominio CH2 e CH3 esposta in SEQ ID NO: 6 o 7.

Viene anche descritta una molecola anticorpale che compete con una 0 molecola anticorpale dell'invenzione per legarsi a LAG-3 e/o PD-L1, o che si lega allo stesso epitopo su LAG-3 e/o PD-L1 di una molecola anticorpale dell'invenzione, in cui la molecola anticorpale comprende sia un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 sia un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio CH3 della molecola 5 anticorpale. Nella tecnica sono noti metodi per determinare la competizione per un antigene da parte di due anticorpi. Ad esempio, la

competizione del legame con un antigene da parte di due anticorpi può essere determinata usando BIAcore. Nella tecnica sono noti in modo simile metodi per mappare l'epitopo legato da un anticorpo.

La molecola anticorpale dell'invenzione si lega preferibilmente a LAG-3 con un'affinità (K_D) di 1×10^{-9} M o con un'affinità che è maggiore. Ad esempio, la molecola anticorpale dell'invenzione può legarsi a LAG-3 con un'affinità (K_D) di 8×10^{-10} M, o un'affinità che è maggiore.

I Fcab hanno un'interfaccia di legame più piccola rispetto agli anticorpi monoclonali poiché i siti di legame dei Fcab formano un frammento anticorpale relativamente compatto con due siti di legame situati in stretta prossimità. Per contro, i bracci di Fab di un tipico mAb sono separati da una regione cerniera flessibile. Anche i due siti leganti l'antigene di un Fcab sono spazialmente vicini tra loro, rispetto a quelli di un mAb tipico. Sulla base di questa interfaccia di legame più piccola e della ridotta flessibilità dei due siti di legame, è stato sorprendente che i Fcab anti-LAG-3 fossero in grado di legarsi e inibire LAG-3 con affinità e potenza simili a un anticorpo monoclonale di riferimento.

La molecola anticorpale dell'invenzione si lega preferibilmente a PD-L1 con un'affinità (K_D) di 1×10^{-9} M o con un'affinità che è maggiore.

L'affinità di legame di una molecola anticorpale ad un antigene affine, come LAG-3 o PD-L1, può essere determinata ad esempio mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR). L'affinità di legame di una molecola anticorpale con un antigene affine, come LAG-3 o PD-L1, espresso su una superficie cellulare può essere determinata mediante citometria a flusso.

La molecola anticorpale della presente invenzione è preferibilmente in grado di legarsi a LAG-3 e PD-L1 espressi sulla superficie di una cellula. La cellula è preferibilmente una cellula cancerosa.

5 La molecola anticorpale della presente invenzione è preferibilmente in grado di legarsi simultaneamente a LAG-3 e PD-L1. In una forma di realizzazione preferita, la molecola anticorpale della presente invenzione è in grado di legarsi simultaneamente a LAG-3 e PD-L1, in cui LAG-3 e PD-L1 sono espressi sulla superficie di una singola cellula, o sulla superficie di due cellule separate.

0 La molecola anticorpale dell'invenzione può legarsi a LAG-3 umano, a LAG-3 murino e/o a LAG-3 di macaco cinomolgo. Preferibilmente, la molecola anticorpale dell'invenzione si lega a LAG-3 umano. In modo maggiormente preferibile, la molecola anticorpale dell'invenzione si lega a LAG-3 umano e PD-L1 umano.

5 La molecola anticorpale dell'invenzione comprende (i) un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1; e (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio costante della molecola anticorpale come esposto nelle rivendicazioni. Le molecole anticorpali che non comprendono un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio costante, come un dominio CH3, della molecola anticorpale non costituiscono pertanto parte della presente invenzione. In modo simile, una molecola che non comprende un sito legante l'antigene basato su CDR per PD-L1 non costituisce parte della presente invenzione.

5 La molecola anticorpale della presente invenzione può essere coniugata a un agente terapeutico o un marcatore rilevabile. In questo caso, la molecola anticorpale può essere indicata come coniugato. Ad

esempio, la molecola anticorpale può essere coniugata a un modulatore del sistema immunitario, molecola citotossica, radioisotopo o marcatore rilevabile. Il modulatore del sistema immunitario o molecola citotossica può essere una citochina. Il marcatore rilevabile può essere un radioisotopo, ad esempio un radioisotopo non terapeutico.

La molecola anticorpale può essere coniugata all'agente terapeutico o marcatore rilevabile, per mezzo di un legame o linker peptidico, vale a dire all'interno di un polipeptide di fusione comprendente detto agente terapeutico o marcatore rilevabile e la molecola anticorpale o un suo componente a catena polipeptidica. Altri mezzi per la coniugazione includono la coniugazione chimica, in particolare la reticolazione che usa un reagente bifunzionale (ad esempio impiegando la guida di selezione dei reagenti reticolanti DOUBLE-REAGENTS™, Pierce).

La molecola anticorpale e l'agente terapeutico o il marcatore rilevabile possono quindi essere collegati tra loro direttamente, ad esempio attraverso qualsiasi legame chimico adatto o attraverso un linker, ad esempio un linker peptidico.

Il linker peptidico può essere un tratto corto (2-20, preferibilmente 2-15, di residui di amminoacidi). Nella tecnica sono noti esempi adatti di sequenze di linker peptidici. È possibile usare uno o più linker diversi. Il linker può avere una lunghezza di circa 5 amminoacidi.

Il legame chimico può essere, ad esempio, un legame covalente o ionico. Esempi di legami covalenti includono legami peptidici (legami ammidici) e legami disolfuro. Ad esempio, la molecola anticorpale e l'agente terapeutico o diagnostico possono essere collegati in modo

covalente. Ad esempio mediante legami peptidici (legami ammidici). Pertanto, la molecola anticorpale e l'agente terapeutico o diagnostico possono essere prodotti (secreti) come polipeptide a catena singola.

5 L'invenzione fornisce inoltre acidi nucleici isolati che codificano per le molecole anticorpali dell'invenzione. L'esperto del settore non avrebbe difficoltà a preparare tali acidi nucleici usando metodi ben noti nella tecnica. Un acido nucleico isolato può essere usato per esprimere la molecola anticorpale dell'invenzione, ad esempio, mediante espressione in una cellula ospite di batterio, lievito, insetto o 0 mammifero. Una cellula ospite preferita è una cellula di mammifero, come una cellula CHO, HEK o NS0. L'acido nucleico sarà generalmente fornito sotto forma di un vettore ricombinante per l'espressione.

L'acido nucleico isolato può, ad esempio, comprendere la sequenza esposta in SEQ ID NO: 142, 4, 9, 14, 19, 24, 29, 34, 39, 44 o 49, che 5 codifica per i domini CH3 rispettivamente di FS18-7-9 (sequenza nucleotidica ottimizzata per codone di CHO), FS18-7-9 (sequenza nucleotidica espressa da HEK293), FS18-7-32, FS18-7-33, FS18-7-36, FS18-7-58, FS18-7-62, FS18-7-65, FS18-7-78, FS18-7-88 e FS18-7-95.

Le cellule ospiti in vitro comprendenti tali acidi nucleici e 0 vettori fanno parte dell'invenzione, così come il loro uso per esprimere le molecole anticorpali dell'invenzione, che possono successivamente essere purificate dalla coltura cellulare e facoltativamente formulate in una composizione farmaceutica. La presente invenzione fornisce pertanto inoltre un metodo per produrre la molecola anticorpale 5 dell'invenzione, comprendente la coltivazione della cellula ospite ricombinante dell'invenzione in condizioni per la produzione della

molecola anticorpale. Metodi per coltivare cellule ospiti adatte come menzionato sopra sono ben noti nella tecnica. Il metodo può ulteriormente comprendere l'isolamento e/o la purificazione della molecola anticorpale. Il metodo può anche comprendere la formulazione della molecola anticorpale in una composizione farmaceutica, facoltativamente con un eccipiente o altra sostanza farmaceuticamente accettabile come descritto di seguito.

È noto che PD-L1 è espresso su molte cellule cancerose, mentre l'espressione di LAG-3 sulle cellule cancerose è più limitata. Entrambi sono espressi su cellule del sistema immunitario. In particolare, è noto che LAG-3 viene espresso su cellule T esauste all'interno dell'ambiente tumorale. Inoltre, i presenti inventori hanno mostrato che l'uso di una molecola anticorpale che si lega sia a LAG-3 sia a PD-L1 è efficace nel sopprimere la crescita tumorale in modelli singenici murini di cancro, e che tali molecole anticorpali sono più efficaci della somministrazione di due molecole di legame che legano rispettivamente LAG-3 e PD-L1.

Pertanto, una molecola anticorpale dell'invenzione può essere usata in un metodo per trattare un cancro in un paziente. Il paziente è preferibilmente un paziente umano.

Le cellule del cancro da trattare che usano la molecola anticorpale dell'invenzione possono esprimere LAG-3, ad esempio sulla loro superficie cellulare. In una forma di realizzazione, le cellule del cancro da trattare possono essere state determinate per esprimere LAG-3, ad esempio sulla loro superficie cellulare. Ad esempio, è stato mostrato che i linfomi a cellule B esprimono LAG-3 sulla loro superficie cellulare. Nella tecnica sono noti metodi per determinare l'espressione

di un antigene su una superficie cellulare e includono, ad esempio, la citometria a flusso.

L'esempio 4 di seguito mostra che le molecole anticorpali della presente invenzione possono essere usate per trattare tumori con alti
5 livelli di cellule immunitarie esprimenti LAG-3, come TIL esprimenti LAG-3, nei topi. Pertanto, in aggiunta, o in alternativa, i tumori del cancro da trattare che usano la molecola anticorpale dell'invenzione possono comprendere cellule immunitarie che esprimono LAG-3. Le cellule immunitarie che esprimono LAG-3, come i TIL che esprimono LAG-3, sono
0 presenti tra le cellule tumorali in molti cancri. In una forma di realizzazione, è stato determinato che i tumori del cancro da trattare usando la molecola anticorpale dell'invenzione contengono cellule immunitarie esprimenti LAG-3. Nella tecnica sono noti metodi per determinare la presenza di cellule immunitarie esprimenti LAG-3 in un
5 tumore o nella periferia del tumore.

L'esempio 4 di seguito mostra anche che le molecole anticorpali della presente invenzione possono essere usate per trattare tumori che esprimono PD-L1 sulla loro superficie cellulare. Pertanto, in aggiunta, o in alternativa, le cellule del cancro da trattare usando la molecola
0 anticorpale dell'invenzione possono esprimere PD-L1, ad esempio sulla loro superficie cellulare. Inoltre, o in alternativa, i tumori del cancro da trattare possono comprendere cellule immunitarie, come TIL, che esprimono PD-L1. Le cellule del cancro da trattare possono essere state determinate per esprimere PD-L1, ad esempio sulla loro superficie
5 cellulare. Inoltre, o in alternativa, i tumori del cancro da trattare possono essere stati determinati per contenere cellule immunitarie, come

TIL, che esprimono PD-L1.

Si prevede che l'espressione di LAG-3 e PD-L1 della superficie cellulare consenta alla molecola anticorpale di legarsi a LAG-3 e PD-L1 espressi sulla superficie della cellula immunitaria e/o della cellula cancerosa. Si ritiene che questo abbia come risultato terapia diretta, ponte e localizzazione delle cellule cancerose e delle cellule immunitarie.

Un cancro da trattare usando una molecola anticorpale dell'invenzione può essere selezionato dal gruppo costituito da linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin (come linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma indolente non-Hodgkin, linfoma delle cellule mantellari, cancro ovarico, cancro della prostata, cancro coloretale, fibrosarcoma, carcinoma a cellule renali, melanoma, cancro del pancreas, cancro della mammella, glioblastoma multiforme, cancro polmonare (come cancro polmonare non a piccole cellule), cancro della testa e del collo (come carcinoma a cellule squamose della testa e del collo), cancro dello stomaco (cancro gastrico), cancro della vescica, cancro della cervice, cancro dell'utero, cancro della vulva, cancro del testicolo, cancro del pene, leucemia (come leucemia linfocitica cronica, leucemia mieloide, leucemia linfoblastoide acuta, o leucemia linfoblastoide cronica), mieloma multiplo, cancro a cellule squamose, cancro del testicolo, cancro esofageo (come adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea), sarcoma di Kaposi, linfoma del sistema nervoso centrale (SNC), carcinoma epatocellulare, cancro nasofaringeo, carcinoma a cellule di Merkel e mesotelioma. È noto, o si prevede che i tumori di questi cancri esprimano PD-L1 sulla loro superficie cellulare e/o contengano cellule

immunitarie, come TIL, esprimenti PD-L1 e/o LAG-3.

Il trattamento del carcinoma a cellule renali, del cancro polmonare (come il cancro polmonare non a piccole cellule), del cancro nasofaringeo, del cancro coloretale, del melanoma, del cancro allo stomaco (cancro gastrico), del cancro esofageo (come l'adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea), del cancro ovarico, del cancro della
5 cervice, del cancro della vescica, del cancro della testa e del collo (come il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo), della leucemia (come la leucemia linfocitica cronica, il linfoma di Hodgkin,
0 il linfoma non-Hodgkin (come il linfoma diffuso a grandi cellule B, il linfoma non-Hodgkin indolente, il linfoma delle cellule mantellari) e del mieloma multiplo usando anticorpi anti-LAG-3 è stato studiato in sperimentazioni cliniche e ha mostrato risultati promettenti. Pertanto, il cancro da trattare usando le molecole anticorpali della presente
5 invenzione può essere un carcinoma a cellule renali, cancro polmonare (come il cancro polmonare non a piccole cellule), cancro nasofaringeo, cancro coloretale, melanoma, cancro allo stomaco (cancro gastrico), cancro esofageo (come l'adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea), cancro ovarico, cancro della cervice, cancro della vescica, cancro della
0 testa e del collo (come il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo), leucemia (come la leucemia linfocitica cronica, il linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin (come il linfoma diffuso a grandi cellule B, il linfoma non-Hodgkin indolente, il linfoma delle cellule mantellari) e mieloma multiplo.

5 Il trattamento di melanoma, cancro coloretale, cancro della mammella, cancro della vescica, cancro a cellule renali, cancro della

vescica, cancro gastrico, cancro della testa e del collo (come carcinoma a cellule squamose della testa e del collo), mesotelioma, cancro polmonare (come cancro polmonare non a piccole cellule), cancro ovarico, cancro a cellule di Merkel, cancro del pancreas, melanoma e carcinoma epatocellulare usando anticorpi anti-PD-L1 è stato anche studiato in sperimentazioni cliniche e ha mostrato risultati promettenti. Pertanto, il cancro da trattare usando le molecole anticorpali della presente invenzione può essere un melanoma, cancro coloretale, cancro della mammella, cancro della vescica, carcinoma a cellule renali, cancro della vescica, cancro gastrico, cancro della testa e del collo (come carcinoma a cellule squamose della testa e del collo), mesotelioma, cancro polmonare (come cancro polmonare non a piccole cellule), cancro ovarico, carcinoma a cellule di Merkel, cancro del pancreas, melanoma o carcinoma epatocellulare.

Cancri preferiti per il trattamento usando le molecole anticorpali della presente invenzione sono cancro polmonare (come cancro polmonare non a piccole cellule), cancro della vescica, cancro della testa e del collo (carcinoma a cellule squamose della testa e del collo), linfoma diffuso a grandi cellule B, cancro gastrico, cancro del pancreas e carcinoma epatocellulare. È noto che i tumori di questi cancri comprendono cellule immunitarie esprimenti LAG-3 e esprimono PD-L1 sulla loro superficie cellulare o comprendono cellule immunitarie esprimenti PD-L1.

Laddove la domanda si riferisce a un particolare tipo di cancro, come il cancro della mammella, questo si riferisce a una trasformazione maligna del tessuto pertinente, in questo caso un tessuto mammario. Un

cancro che origina dalla trasformazione maligna di un tessuto diverso, ad esempio tessuto ovarico, può avere come risultato lesioni metastatiche in un'altra sede nel corpo, come la mammella, ma non è quindi un cancro della mammella come indicato nella presente, ma un cancro ovarico.

5 Il cancro può essere un cancro primario o secondario. Pertanto, la molecola anticorpale della presente invenzione può essere per l'uso in un metodo per il trattamento del cancro in un paziente, in cui il cancro è un tumore primario e/o una metastasi tumorale.

Le molecole anticorpali dell'invenzione sono progettate per essere
0 usate in metodi di trattamento di pazienti, preferibilmente pazienti umani. Le molecole anticorpali saranno solitamente somministrate sotto forma di una composizione farmaceutica, che può comprendere almeno un componente oltre alla molecola anticorpale, come un eccipiente farmaceuticamente accettabile. Ad esempio, una composizione farmaceutica
5 della presente invenzione può comprendere, oltre al principio attivo, un eccipiente, trasportatore, tampone, stabilizzante o altri materiali farmaceuticamente accettabili ben noti agli esperti del settore. Tali materiali devono essere atossici e non devono interferire con l'efficacia del principio attivo. La natura precisa del trasportatore o altro
0 materiale dipenderà dalla via di somministrazione, che può essere mediante iniezione, ad esempio endovenosa o sottocutanea. La molecola anticorpale può essere somministrata per via endovenosa o sottocutanea.

Le composizioni farmaceutiche liquide comprendono generalmente un trasportatore liquido come acqua, petrolio, oli animali o vegetali, olio
5 minerale o olio sintetico. Possono essere inclusi soluzione salina fisiologica, soluzione di destrosio o di altro saccaride o glicoli come

etilen glicole, propilen glicole o polietilen glicole.

Per l'iniezione endovenosa o l'iniezione in corrispondenza del sito dell'affezione, la molecola anticorpale o la composizione farmaceutica comprendente la molecola anticorpale è preferibilmente sotto forma di una soluzione acquosa accettabile per via parenterale che è apirogena e ha pH, isotonicità e stabilità adatti. Gli esperti del settore sono ben in grado di preparare soluzioni adatte usando, ad esempio, veicoli isotonici come iniezione di cloruro di sodio, iniezione di Ringer, iniezione di Ringer lattato. A seconda delle necessità, possono essere impiegati conservanti, stabilizzanti, tamponi, antiossidanti e/o altri additivi. Molti metodi per la preparazione di formulazioni farmaceutiche sono noti agli esperti del settore. Si veda, ad esempio, Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Una composizione comprendente molecole anticorpali secondo la presente invenzione può essere somministrata da sola o in combinazione con altri trattamenti, simultaneamente o in sequenza o come preparazione combinata con uno o più altri agenti terapeutici, a seconda della condizione da trattare. Ad esempio, una molecola anticorpale dell'invenzione può essere somministrata in combinazione con un agente terapeutico esistente per la malattia da trattare, ad esempio un cancro come menzionato sopra. Ad esempio, una molecola anticorpale della presente invenzione può essere somministrata al paziente in combinazione con una seconda terapia anti-cancro, come chemioterapia, vaccinazione anti-tumorale (indicata anche come vaccinazione contro il cancro), radioterapia, immunoterapia, un virus oncolitico, terapia con cellule T

di recettori chimerici di antigene (CAR) o terapia ormonale.

Si prevede che la molecola anticorpale dell'invenzione possa agire come adiuvante nella terapia contro il cancro, come chemioterapia, vaccinazione antitumorale o radioterapia. Senza voler essere legati alla
5 teoria, si ritiene che la somministrazione della molecola anticorpale al paziente come parte della chemioterapia, della vaccinazione antitumorale o della radioterapia innescherà una risposta immunitaria maggiore contro gli antigeni associati al cancro LAG-3 e PD-L1, rispetto
0 a quanto si ottiene con la sola chemioterapia, la vaccinazione antitumorale o la radioterapia. Ad esempio, le terapie anti-LAG-3 hanno mostrato una buona efficacia nel trattamento delle patologie a base virale nei topi (Blackburn SD, et al., 2009).

Un metodo per trattare il cancro in un paziente può quindi comprendere la somministrazione al paziente di una quantità
5 terapeuticamente efficace di una molecola anticorpale secondo la presente invenzione in combinazione con un agente chemioterapico, un vaccino antitumorale, un radionuclide, un agente immunoterapico, virus oncolitici, cellule CAR-T o un agente per la terapia ormonale. L'agente chemioterapico, il vaccino antitumorale, il radionuclide, l'agente
0 immunoterapico, i virus oncolitici, le cellule CAR-T, o l'agente per la terapia ormonale è preferibilmente un agente chemioterapico, vaccino antitumorale, radionuclide, agente immunoterapico, virus oncolitici, cellule CAR-T, o agente per la terapia ormonale per il cancro in questione, vale a dire un agente chemioterapico, vaccino antitumorale,
5 radionuclide, agente immunoterapico, virus oncolitici, cellule CAR-T, o agente per la terapia ormonale che si è dimostrato efficace nel

trattamento del cancro in questione. La selezione di un agente chemioterapico, vaccino antitumorale, radionuclide, agente immunoterapico, virus oncolitici, cellule CAR-T o agente per la terapia ormonale adatto/i che ha/hanno mostrato di essere efficace/i per il
5 cancro in questione rientra ampiamente nelle capacità del professionista esperto.

Ad esempio, laddove il metodo comprenda la somministrazione al paziente di una quantità terapeuticamente efficace di una molecola anticorpale secondo la presente invenzione in combinazione con un agente
0 chemioterapico, l'agente chemioterapico del gruppo costituito da: taxani, antibiotici citotossici, inibitori di tirosin-chinasi, inibitori di PARP, inibitori di enzimi B_RAF, agenti alchilanti, analoghi del platino, analoghi nucleosidici, derivati di talidomide, agenti chemioterapici antineoplastici e altri. I taxani includono docetaxel,
5 paclitaxel e nab-paclitaxel; gli antibiotici citotossici includono actinomicina, bleomicina, antracicline, doxorubicina e valrubicina; gli inibitori della tirosin-chinasi includono erlotinib, gefitinib, axitinib, PLX3397, imatinib, cobemitinib e trametinib; gli inibitori di PARP includono piraparib; gli inibitori dell'enzima B-Raf includono
0 vemurafenib e dabrafenib; gli agenti alchilanti includono dacarbazina, ciclofosfamide, temozolomide; gli analoghi del platino includono carboplatino, cisplatino e oxaliplatino; gli analoghi nucleosidici includono gemcitabina e azacitidina; gli antineoplastici includono fludarabina. Altri agenti chemioterapici adatti per l'uso nella presente
5 invenzione includono metotrexato, defactinib, entinostat, pemetrexed, capecitabina, eribulina, irinotecan, fluorouracile e vinblastina.

Le strategie di vaccinazione per il trattamento dei cancri sono state implementate sia nella clinica sia discusse in dettaglio all'interno della letteratura scientifica (come Rosenberg, S. 2000 Development of Cancer Vaccines). Ciò comporta principalmente strategie per indurre il sistema immunitario a rispondere a vari marker cellulari espressi da cellule cancerose autologhe o allogeniche usando quelle cellule come metodo di vaccinazione, sia con sia senza fattore di stimolazione delle colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF). GM-CSF provoca una forte risposta nella presentazione dell'antigene e funziona particolarmente bene quando impiegato con dette strategie.

La somministrazione può essere in una "quantità terapeuticamente efficace", essendo questa sufficiente a mostrare benefici per un paziente. Tale beneficio può essere almeno il miglioramento di almeno un sintomo. Pertanto "trattamento" di una malattia specificata si riferisce al miglioramento di almeno un sintomo. La quantità effettiva somministrata, e la velocità e il tempo di somministrazione dipenderanno dalla natura e dalla gravità di ciò che viene trattato, dal particolare paziente in corso di trattamento, dalla condizione clinica del singolo paziente, dalla causa del disturbo, dal sito di erogazione della composizione, dal tipo di molecola anticorpale, dal metodo di somministrazione, dalla pianificazione della somministrazione e da altri fattori noti ai medici curanti. La prescrizione del trattamento, ad esempio le decisioni sul dosaggio eccetera, rientra nella responsabilità dei medici curanti e di altri medici e può dipendere dalla gravità dei sintomi e/o dalla progressione di una malattia che viene trattata. Nella tecnica sono ben note dosi appropriate di molecole anticorpali (Ledermann

et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; e Bagshawe et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). È possibile usare dosaggi specifici indicati nella presente, o nel Physician's Desk Reference (2003) come appropriato per una molecola anticorpale che viene somministrata. Una quantità terapeuticamente efficace o una dose adatta di una molecola anticorpale può essere determinata confrontando la sua attività *in vitro* e l'attività *in vivo* in un modello animale. Sono noti metodi per estrapolare dosaggi efficaci all'uomo nei topi e in altri animali di test. La dose precisa dipenderà da una serie di fattori, incluse la possibilità di trattare la dimensione e la sede dell'area da trattare e la natura precisa della molecola anticorpale. I trattamenti possono essere ripetuti a intervalli giornalieri, due volte alla settimana, settimanali o mensili, a discrezione del medico. Il trattamento può essere somministrato prima e/o dopo l'intervento chirurgico, e può essere somministrato o applicato direttamente in corrispondenza del sito anatomico del trattamento chirurgico.

Quando usato nella presente, il termine "e/o" deve essere interpretato come la specifica descrizione di ciascuna/o di due caratteristiche o componenti specificati con o senza l'altro/a. Ad esempio, "A e/o B" deve essere interpretato come la specifica descrizione di ciascuno di (i) A, (ii) B, e (iii) A e B, proprio come se ciascuno fosse esposto singolarmente nella presente.

Salvo che il contesto detti diversamente, le descrizioni e le definizioni delle caratteristiche esposte sopra non sono limitate ad alcun aspetto o forma di realizzazione particolare dell'invenzione, che

è come esposto nelle rivendicazioni, e si applicano ugualmente a tutti gli aspetti e le forme di realizzazione descritti/e.

Certi aspetti e forme di realizzazione dell'invenzione verranno ora illustrati a titolo esemplificativo e con riferimento alle figure descritte sopra.

Esempi

Esempio 1 - Selezione e caratterizzazione di molecole di Fcab

1.1 Selezione naïve e maturazione dell'affinità di Fcab anti-LAG-3 umani

1.1.1 Selezione naïve

Librerie di fagi naïve che esibiscono il dominio CH3 di IgG1 umana (numerazione IMGT 1,4-130) con randomizzazione all'interno delle anse AB (residui 14-18) e EF (residui 92-101) sono state usate per la selezione con antigene contro LAG-3 umano ricombinante con tag Fc (LAG-3 Fc) (R&D systems, 2319-L3-050). Le librerie sono state selezionate in tre cicli usando antigene catturato su perle di Proteina A (Life Technologies, 10002D) o Proteina G (Life Technologies, 10004D). I prodotti sono stati sottoposti a screening mediante ELISA e leganti positivi subclonati ed espressi come Fcab solubili (contenenti una cerniera troncata) in *Pichia pastoris* usando il kit di espressione *Pichia EasySelect* (Life Technologies, K1740-01). I Fcab sono stati poi sottoposti a screening per il legame a LAG-3 Fc umano ricombinante su Biacore 3000 (GE Healthcare). In breve, LAG-3 Fc (R&D systems, 2319-L3-050) è stato accoppiato a una densità di 7200 RU a un chip CM5 (GE Healthcare, BR-100012) usando accoppiamento amminico (GE Healthcare, BR-1000-50). I Fcab sono stati diluiti in tampone HBS-P (GE Healthcare,

BR100368) e iniettati a 250 nM, 500 nM e 1000 nM per 3 minuti e poi lasciati dissociare in tampone per 5 minuti. I dati sottratti di riferimento (cella di flusso di LAG-3 Fc 2 - cella di flusso in bianco) sono stati analizzati usando il software BIAevaluation 3.2 per identificare il legame. I Fcab sono stati quindi testati per il legame a LAG-3 umano espresso da cellule HEK (LAG-3 clonato in vettore pcDNA5FRT [Life Technologies, V6010-20] [Si veda la sezione 1.4.5 per la metodologia]). In breve, le cellule HEK 293 che sovraesprimono LAG-3 umano coltivato in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di Blastomicina (Melford Laboratories Ltd, B1105) e 1 µg/ml di Doxibicina (Sigma, D9891) sono state staccate dai palloni per coltura tissutale usando il tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014) e seminate in piastre a 96 pozzetti con fondo a V a 2×10^5 cellule/pozzetto. I Fcab sono stati incubati con le cellule a 5 µM in un volume di 100 µl per 1 ora a 4 °C. Le piastre sono state lavate, l'anticorpo secondario (Anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) è stato diluito 1:1000 in PBS e 100 µl sono stati aggiunti alle cellule e incubati per 30 minuti a 4 °C. Le piastre sono state lavate e le cellule sono state risospese in 100 µl di PBS contenente 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). La piastra è stata letta su un citometro BD FACSCanto II (BD Biosciences) e i dati sono stati analizzati usando FlowJoX. I Fcab sono stati poi espressi in cellule di mammifero mediante trasformazione usando lipofectamina (Life Technologies, 11668-019) in cellule 293 Fip-In T-Rex (Life Technologies, R780-07). I Fcab leganti LAG-3 sono stati testati per l'inibizione del

legame di MHC umane di classe II su cellule A375 (ATCC, CRL-1619) a LAG-3 Fc ricombinante (usando la metodologia nell'esempio 1.6). 54 sequenze di Fcab unici sono state identificate da tre cicli di selezione fagica, e 12 di questi Fcab sono stati determinati per legarsi a LAG-3 Fc mediante analisi BIAcore e/o legarsi a cellule HEK esprimenti LAG-3. Tre dei Fcab selezionati erano anche in grado di inibire l'interazione di LAG-3 con MHC di classe II e sono stati selezionati per la maturazione di affinità. I tre Fcab sono stati denominati FS18-3, FS18-7 e FS18-21.

1.1.2 Maturazione di affinità

0 **Prima maturazione di affinità**

Sei librerie di maturazione di affinità di phage display sono state costruite randomizzando cinque residui nell'ansa AB (residui 14-18) e cinque (residui 92-94 e 97-98) o otto (residui 92-94 e 97-101) residui nell'ansa EF di ciascuno dei tre Fcab identificati usando il processo di selezione naive descritto sopra.

Le librerie di maturazione di affinità sono state selezionate usando LAG-3 Fc umano ricombinante (R&D systems, 2319-L3-050) e cellule HEK che esprimono LAG-3 umano (come descritto sopra). I prodotti sono stati sottoposti a screening mediante phage ELISA, i leganti positivi sono stati subclonati ed espressi come Fcab solubili (contenenti una cerniera troncata) in cellule HEK Expi293 (Fcab clonati in vettore pTT5 [National Research Council of Canada] trasfettate usando il kit di trasfezione ExpiFectamine 293 [Life Technologies, A14524] in cellule Expi293F [Life technologies, A14527]). I Fcab solubili espressi in HEK sono stati quindi sottoposti a screening per il legame a LAG-3 umano espresso da cellule, il legame a LAG-3 di cinomolgo espresso da cellule (metodologia come

nell'esempio 1.4.3) e la capacità di bloccare il legame di MHC di classe II con LAG-3 Fc ricombinante (metodologia come nell'esempio 1.6). I Fcab bloccanti sono stati ulteriormente testati per determinare se fossero in grado di invertire l'inibizione indotta da LAG-3 della secrezione di IL-2 in un saggio di attivazione di cellule T (metodologia come nell'esempio 2.1). 61 Fcab anti-LAG-3 unici sono stati identificati dalle sei librerie di maturazione di affinità usando questi metodi di screening. I Fcab con affinità maturata della linea FS18-7 hanno mostrato di avere il più alto livello di reattività crociata con LAG-3 di macaco cinomolgo. I tre Fcab di questa linea con il legame più forte a LAG-3 Fc di macaco cinomolgo e la più alta attività nel saggio di attivazione delle cellule T (denominati FS18-7-7, FS18-7-9 e FS18-7-11) sono stati selezionati per un'ulteriore maturazione di affinità. Questi tre Fcab hanno anche mostrato di bloccare l'interazione di LAG-3 Fc con le MHC di classe II espresse da cellule.

Seconda maturazione di affinità

Un pool dei tre Fcab (FS18-7-7, FS18-7-9 e FS18-7-11) dalla prima maturazione di affinità è stato usato per creare ulteriori librerie di maturazione di affinità. L'ansa CD è stata randomizzata rigidamente usando primer randomizzati di ELLA Biotech. Una porzione di posizioni amminoacidiche nell'ansa CD (residui 45.1-78) è stata randomizzata usando una distribuzione equimolare di amminoacidi esclusa la cisteina. È stata anche effettuata una PCR incline agli errori in tutta la sequenza di dominio CH3 per introdurre ulteriori mutazioni che possono potenziare il legame.

Le librerie di maturazione di affinità sono state generate in fagi

e selezioni eseguite contro LAG-3 avi-Fc ricombinante (BPS Bioscience, 71147) e cellule HEK hLAG-3 biotinilati e sottoposte a screening per il legame a LAG-3 Fc ricombinante (R&D systems, 2319-L3-050) mediante phage ELISA. 86 Fcab unici (contenenti una cerniera troncata) sono stati espressi in cellule HEK293F. I Fcab selezionati sono stati anche sottoposti a screening per l'attività in un saggio di attivazione delle cellule T come descritto sopra. I nove Fcab identificati durante la seconda maturazione di affinità con la massima attività nel saggio di attivazione delle cellule T (FS18-7-32; FS18-7-33; FS18-7-36; FS18-7-58; FS18-7-62; FS18-7-65; FS18-7-78; FS18-7-88; e FS18-7-95), così come il clone Fcab progenitore, FS18-7-9, sono stati poi ulteriormente caratterizzati come descritto di seguito. Nella **Figura 1A** è mostrato un allineamento di sequenza di questi nove Fcab contro il clone Fcab progenitore, FS18-7-9. La **Figura 1B** descrive in dettaglio l'identità di sequenza percentuale di ciascuno dei nove cloni Fcab rispetto al clone Fcab progenitore, FS18-7-9. I Fcab originati dalla maturazione di affinità degli altri due cloni Fcab progenitori, FS18-7-7 e FS18-7-11, non erano candidati promettenti come quelli originati dalla maturazione di affinità di FS18-7-9 e non sono stati quindi ricercati ulteriormente.

1.2 Selezione di Fcab surrogato specifico per LAG-3 murino

Fcab FS18-7, che è stato selezionato usando il protocollo di selezione naïve descritto sopra, è stato usato per generare librerie di fagi da selezionare contro LAG-3 murino. Sono stati eseguiti due cicli di maturazione di affinità, e i cloni Fcab FS18-7-108-29 e FS18-7-108-35, che hanno mostrato un legame specifico ad alta affinità con LAG-3 murino sono stati selezionati dopo maturazione di affinità. È stata

confermata la capacità di FS18-7-108-29 e FS18-7-108-35 di inibire il LAG-3 murino in un saggio di attivazione delle cellule T. La mappatura dell'epitopo che usa l'ottetto (Forteo Bio) ha mostrato che i Fcab anti-LAG-3 murino competono con i Fcab anti-LAG-3 umani (selezionati dopo la seconda maturazione di affinità come descritto sopra) per legarsi a LAG-3 umano. Vi sono differenze di 4 e 8 residui tra Fcab anti-LAG-3 umani e Fcab anti-LAG-3 murini. Si prevede pertanto che i Fcab anti-LAG-3 murini rappresentino surrogati adatti per il legame e la funzione dei Fcab anti-LAG-3 umani nei topi.

1.3 Costruzione ed espressione di mAb² fittizio

È stato preparato il mAb² "fittizio" comprendente i Fcab anti-LAG-3 umani e i Fcab anti-LAG-3 murini principali identificati in 1.1 e 1.2 di cui sopra al fine di consentire la caratterizzazione di questi Fcab in formato mAb². Questi mAb² fittizi sono stati preparati dai Fcab anti-LAG-3 e dalle regioni variabili dell'anticorpo anti-FITC 4420 (si veda SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, e SEQ ID NO: 85 per i dettagli) (Bedzyk, W. D., et al. 1989 e Bedzyk, W. D., et al. 1989). I mAb² fittizi sono stati preparati sia con (SEQ ID NO: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 e 81) sia senza (SEQ ID NO: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 e 82) la mutazione LALA nel dominio CH2 della catena pesante (si veda la sezione 1.5 di seguito per i dettagli) e comprendevano inoltre la catena leggera del mAb anti-FITC 4420 (SEQ ID NO: 85). Il mAb² fittizio è stato prodotto mediante espressione transitoria in cellule HEK293-6E e purificato usando colonne A per proteina mAb Select SuRe.

1.4 Affinità di legame di Fcab a LAG-3

1.4.1 Affinità di legame di Fcab a LAG-3 umano come determinato mediante

risonanza plasmonica di superficie (SPR)

È stato usato un BIAcore T200 (GE Healthcare) per misurare l'affinità di Fcab anti-LAG-3 umani nel formato di mAb² fittizio per LAG-3 umano. La cella di flusso 4 di un chip sensore CM5 (GE Healthcare, BR1005-30) è stata immobilizzata con LAG-3-Fc umano (R&D Systems, 2319-L3-050), e la cella di flusso 3 è stata immobilizzata con tampone per riferimento usando il kit di accoppiamento amminico (GE Healthcare, BR-1000-50). LAG-3-Fc è stato diluito a 5 µg/ml in acetato di sodio pH 5 (ForteoBio, 18-1069) e iniettato ad una portata di 10 µl/min per 12 secondi, seguito da disattivazione della superficie mediante iniezione di etanolamina per 420 secondi. Il livello di immobilizzazione era di 158 RU. Il mAb² fittizio (o mAb anti-LAG-3 umano di controllo, 25F7) è stato diluito in tampone HBS-P (GE Healthcare, BR-1003-68) in una serie di diluizioni di 2 volte da 4 µg/ml. Il mAb di controllo/mAb² fittizio sono stati iniettati con un tempo di associazione di 240 secondi a 30 µl/min e un tempo di dissociazione di 300 secondi a 30 µl/min. La superficie è stata rigenerata usando NaOH 25 mM per 30 secondi a 100 µl/minuto. I dati sono stati sottratti e analizzati per doppio riferimento usando il software BIAevaluation 3.2 per calcolare le costanti cinetiche. I Fcab nel formato mAb² fittizio avevano affinità per LAG-3 umano nell'intervallo 0,8 - 1,1 nM (**Tabella 1**), che è simile all'affinità del mAb anti-LAG-3 umano di riferimento 25F7. Ciò è stato sorprendente poiché i Fcab hanno un'interfaccia di legame più piccola rispetto agli anticorpi monoclonali poiché i siti di legame dei Fcab formano un frammento anticorpale relativamente compatto con due siti di legame situati in stretta prossimità. Per contro, i bracci di Fab di un

tipico mAb sono separati da una regione cerniera flessibile. Sulla base di questa interfaccia di legame minore e della ridotta flessibilità associata dei due siti di legame nella regione Fc, è stato inaspettato che i Fcab anti-LAG-3 fossero in grado di legarsi a e inibire LAG-3 con affinità e potenza simili all'anticorpo di riferimento 25F7.

Tabella 1: Affinità di legame di Fcab specifici per LAG-3 in formato mAb² fittizio a LAG-3 umano

Fcab anti-LAG-3 umano in formato mAb ² fittizio e mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7	K _D (M)
FS18-7-9	8,3 x 10 ⁻¹⁰
FS18-7-62	9,5 x 10 ⁻¹⁰
FS18-7-78	8,4 x 10 ⁻¹⁰
FS18-7-32	8,6 x 10 ⁻¹⁰
FS18-7-36	8,9 x 10 ⁻¹⁰
FS18-7-65	1,1 x 10 ⁻⁹
25F7	3,2 x 10 ⁻¹⁰

1.4.2 Affinità di legame di Fcab surrogato specifico per LAG-3 murino a LAG-3 murino come determinato mediante SPR

È stato usato un Biacore 3000 (GE Healthcare) per misurare l'affinità di Fcab surrogati specifici per LAG-3 murino a LAG-3 murino. L'accoppiamento amminico (kit di accoppiamento amminico, GE Healthcare, BR-1000-50) è stato usato per rivestire mLAG-3 Fc (R&D Systems, 3328-

L3-050) diluito in acetato di sodio 10 mM, pH 5,0 (ForteBio, 18-1069), direttamente su un chip CM5 (GE Healthcare, BR-1000-12). La cella di flusso 1 è stata rivestita con Fc murino (SinoBiological, 51094-MNAH), e la cella di flusso 2 è stata rivestita con mLAG-3 Fc a 950 RU. I Fcab sono stati diluiti in tampone HBS-P (GE Healthcare, BR-1003-68) e iniettati a varie concentrazioni (diluizioni quaduple da 100 nM) per 3 minuti a 20 μ l/minuto e poi lasciati dissociare in tampone per 12 minuti. Il chip è stato rigenerato mediante iniezione di glicina 10 mM pH 2,5 per 30 secondi a 30 μ l/minuto. I dati sono stati sottratti e analizzati per doppio riferimento usando il software BIAevaluation 3.2 per calcolare le costanti cinetiche. Fcab surrogati testati legati al LAG-3 murino con affinità nanomolare a singola cifra come esposto nella **Tabella 2**.

Tabella 2: Affinità di legame (K_D) di Fcab surrogati specifici per LAG-3 a LAG-3 murino

Fcab surrogati specifici per LAG-3 murino	Affinità K_D (nM)
FS18-7-108-29	1,5
FS18-7-108-35	2,1

1.4.3 Affinità di legame di Fcab a LAG-3 umano espresso sulle cellule come determinato mediante citometria a flusso

Produzione delle linee cellulari che sovraesprimono LAG-3

La metodologia di trasduzione lentivirale è stata usata per generare cellule DO11.10 (National Jewish Health) che sovraesprimono LAG-3 umano, di cinomolgo o murino usando il sistema di impaccamento Lenti-X HTX

(Clontech, Cat. N. 631249). Il vettore di espressione Lenti-X (pLVX) (Clontech, Cat. N. 631253), contenente cDNA di LAG-3 murino (SEQ ID NO: 96), cDNA di LAG-3 umano (SEQ ID NO: 95) o cDNA di LAG-3 di cinomolgo (SEQ ID NO: 97), è stato co-trasfettato con una miscela di impaccamento Lenti-X HTX nella linea di cellule 293T Lenti-X (Clontech, Cat. N. 632180) per generare virus. La linea cellulare DO11.10 è stata trasdotta usando i vettori lentivirali prodotti con il sistema di impaccamento Lenti-X HTX.

L'affinità dei Fcab anti-LAG-3 umani in formato mAb² fittizio con cellule che esprimono LAG-3 umano (linea cellulare DO11.10 trasfettata con LAG-3 umano) è stata misurata usando citometria a flusso. Le diluizioni di mAb² e mAb di controllo (2 x concentrazione finale) sono state preparate in triplicato in 1 x DPBS (Gibco, 14190-094). Sono state preparate sospensioni di cellule DO11.10: LAG-3 in PBS+2% di BSA (Sigma, A7906) e seminate a 4×10^{-6} cellule/ml con 50 μ l/pozzetto in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897). 50 μ l delle diluizioni di mAb² o mAb di controllo (mAb anti-LAG-3 umano, 25F7) sono stati aggiunti ai pozzetti contenenti cellule (volume finale 100 μ l) e sono stati incubati a 4 °C per 1 ora. Le piastre sono state lavate e 100 μ l/pozzetto di anticorpo secondario (anticorpo anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) diluiti 1:1000 in PBS+2% di BSA sono stati poi aggiunti e incubati per 30 minuti a 4 °C al buio. Le piastre sono state lavate e risospese in 100 μ l di PBS contenente DAPI (Biotium, 40043) a 1 mg/ml. Le piastre sono state lette usando un citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488 nm/530/30). I dati

sono stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. Tutti i Fcab testati nel formato mAb² fittizio e nel mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7, hanno legato LAG-3 umano con affinità simile (EC₅₀), nell'intervallo di 1,2-2,1 nM come esposto nella **Tabella 3**.

Tabella 3: Affinità di legame di Fcab anti-LAG-3 umani in formato mAb² fittizio a cellule DO11.10 che esprimono LAG-3 umano come determinato mediante citometria a flusso

Fcab anti-LAG-3 umano in formato mAb ² fittizio e mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-9	1,2
FS18-7-32	1,6
FS18-7-33	1,5
FS18-7-36	1,5
FS18-7-62	2,1
FS18-7-65	1,6
FS18-7-78	1,7
25F7	2,1

0 1.4.4 Affinità di legame di Fcab a LAG-3 di cinomolgo espresso sulle cellule come determinato mediante citometria a flusso

L'affinità dei Fcab anti-LAG-3 umani in formato mAb² fittizio a cellule che esprimono LAG-3 di cinomolgo (linea cellulare DO11.10

trasfettata con LAG-3 di cinomogo) è stata misurata usando citometria a flusso. Le diluizioni di mAb² e mAb di controllo (2 x concentrazione finale) sono state preparate in triplicato in 1 x DPBS (Gibco, 14190-094). Sono state preparate sospensioni di cellule DO11.10: LAG-3 in 5 PBS+2% di BSA (Sigma, A7906) e seminate a 4×10^{-6} cellule/ml con 50 μ l/pozzetto in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897). 50 μ l delle diluizioni di mAb² o mAb di controllo (mAb anti-LAG-3 umano, 25F7) sono stati aggiunti ai pozzetti contenenti cellule (volume finale 100 μ l) e sono stati incubati a 4 °C per 1 ora. Le piastre sono state 0 lavate e 100 μ l/pozzetto di anticorpo secondario (anticorpo anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) diluiti 1:1000 in PBS+2% di BSA sono stati poi aggiunti e incubati per 30 minuti a 4 °C al buio. Le piastre sono state lavate e risospese in 100 μ l di PBS contenente DAPI (Biotium, 40043) a 1 mg/ml. Le piastre sono state lette usando un 5 citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488 nm/530/30). I dati sono stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. I Fcab testati in formato mAb² fittizio si sono legati a LAG-3 di cinomolgo con affinità 0 di 0,5-0,6 nM indicando la previsione che gli studi tossicologici nei macaco cinomolgo siano predittivi degli effetti osservati nell'uomo (si veda la **Tabella 4**). Il mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7, lega LAG-3 di cinomolgo con un'affinità di 15 volte inferiore (EC₅₀) (**Tabella 4**).

Tabella 4: Affinità di legame di Fcab anti-LAG-3 a cellule DO11.10 che esprimono LAG-3 di cinomolgo mediante citometria a flusso

Fcab anti-LAG-3 umano in formato mAb ² fittizio e mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-9	0,6
FS18-7-62	0,5
FS18-7-78	0,5
25F7	9,0

1.4.5 Affinità di legame di Fcab anti-LAG-3 murini surrogati e Fcab anti-LAG-3 umani a LAG-3 murino espresso su cellule come determinato mediante citometria a flusso

Produzione di cellule HEK che sovraesprimono mLAG-3

La sequenza di LAG-3 murino (SEQ ID NO: 96) è stata subclonata in vettore pcDNA5FRT (Life Technologies, V6010-20) usando la digestione di restrizione KpnI (NEB, R0142) e NotI (NEB, R0146). Il vettore è stato poi trasformato nella linea di cellule HEK 293 FIp-In T-REx (Life Technologies, R780-07) usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, 11668-019). Cellule 293 FIp-In T-REx trasformate sono state fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di blasticidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) per 3-4 settimane fino a quando non sono emerse colonie di cellule trasformate stabilmente. Queste colonie sono state amplificate

in presenza di 1 µg/ml di doxyciclina (Sigma, D9891) e testate per l'espressione di LAG-3 murino usando anti-LAG-3 murino coniugato con PE (clone C9B7W, BD Biosciences, 552380).

L'affinità dei Fcab anti-LAG-3 murini surrogati (contenenti la cerniera troncata; SEQ ID NO: 58) a LAG-3 murino espresso dalle cellule è stata determinata usando la citometria a flusso. Cellule HEK che esprimono mLAG-3 fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di Blastidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) e 1 µg/ml di Doxyciclina (Sigma, D9891) sono state staccate dai palloni per coltura tissutale usando tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014) e seminate in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897) a 2×10^5 cellule/pozzetto. Per pellettare le cellule, le piastre sono state centrifugate a 1500 giri/minuto per 3 minuti a 4 °C. Una serie di diluizioni dei Fcab (o mAb di controllo) è stata incubata con le cellule in un volume di 100 µl per 1 ora a 4 °C. Le piastre sono state lavate e l'anticorpo secondario (anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098 per Fcab o IgG anti-ratto (H+L), coniugato con Alexa Fluor 488, ThermoFisher, A-11006 per C9B7W) è stato diluito 1:1000 in PBS e 100 µl sono stati aggiunti alle cellule per 30 minuti a 4 °C (le piastre sono state tenute al buio). Le piastre sono state poi lavate e le cellule sono state risospese in 100 µl di PBS contenente 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). Le piastre sono state lette usando un citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488 nm/530/30). I dati sono

stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. I Fcab testati si sono legati a LAG-3 murino con affinità simile (si veda **Tabella 5**). Il mAb contro LAG-3 di riferimento, C9B7W (2B Scientific, BE0174-50MG), lega LAG-3 murino con un'affinità 17 volte inferiore (EC_{50}) rispetto ai Fcab (**Tabella 5**).

Tabella 5: Affinità di legame di Fcab anti-LAG-3 surrogati murini alle cellule HEK che esprimono il LAG-3 murino mediante citometria a flusso

Fcab anti-LAG-3 murini e mAb anti-LAG-3 murino di riferimento, C9B7W	EC_{50} (nM)
FS18-7-108-29	4,5
FS18-7-108-35	4,5
C9B7W	79

L'affinità del Fcab anti-LAG-3 umano FS18-7-9 in formato mAb² fittizio a LAG-3 murino espresso dalle cellule è stata determinata usando la citometria a flusso. Cellule HEK che esprimono mLAG-3 fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 μ g/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 μ g/ml di Blastocidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) e 1 μ g/ml di Doxibiciclina (Sigma, D9891) sono state staccate dai palloni per coltura tissutale usando tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014). Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 1500 giri/minuto per 3 minuti a 4 °C per pellettare le cellule e poi risospese in 1 x DPBS poi seminate in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897) a $1,2 \times 10^5$ cellule/pozzetto in

30 µl. È stato aggiunto un volume 1:1 di una serie di diluizioni del mAb² (o mAb di controllo) e incubato con le cellule per 1 ora a 4 °C. Le piastre sono state lavate e l'anticorpo secondario (Anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) è stato diluito 1:1000 in PBS e 60 µl sono stati aggiunti alle cellule per 30 minuti a 4 °C (le piastre sono state tenute al buio). Le piastre sono state poi lavate e le cellule sono state risospese in 60 µl di PBS contenente 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). Le piastre sono state lette usando un citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488 nm/530/30). I dati sono stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. Il Fcab anti-LAG-3 umano FS18-7-9 in formato mAb² fittizio si è legato a LAG-3 murino con EC₅₀ di 19 nM rispetto a EC₅₀ di 2,6 nM per il Fcab anti-LAG-3 murino surrogato FS18-7-9-108 (**Tabella 6**). Il mAb umano, 25F7 non mostra alcun legame rilevabile al LAG-3 murino, indicando che il Fcab contro LAG-3 umano, FS18-7-9, ha un epitopo di legame diverso sul LAG-3 rispetto a quello del 25F7.

Tabella 6: Affinità di legame di Fcab anti-LAG-3 umano FS18-7-9 a cellule HEK che esprimono LAG-3 murino mediante citometria a flusso

Fcab anti-LAG-3 umano, Fcab anti-LAG-3 murino e mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	2,6
FS18-7-9	19

Fcab anti-LAG-3 umano, Fcab anti-LAG-3 murino e mAb anti-LAG-3 umano di riferimento, 25F7	EC ₅₀ (nM)
25F7	Nessun legame

1.5 Affinità di legame di Fcab ai recettori Fc

È noto che l'introduzione della mutazione LALA nel dominio CH2 di IgG1 umana riduce il legame del recettore Fcγ (Bruhns, P., et al. (2009); e Xu, D. et al. (2000)). BIAcore è stato usato per confermare che la mutazione LALA aveva ridotto l'affinità di legame dei Fcab (nel formato mAb² fittizio) ai recettori Fcγ. Il saggio di legame di FcγR umano è stato eseguito su uno strumento Biacore T200 (GE Healthcare) usando i Fcab nel formato mAb² fittizio. I FcγR umani (R&D Systems, 1257-FC, 1330-CD, 1875-CD, 4325-FC) sono stati immobilizzati usando un accoppiamento amminico (kit di accoppiamento amminico, GE Healthcare, BR-1000-50) su un chip CM5 Serie S (GE Healthcare, BR-1005-30) a una densità superficiale di 370 RU per FcγRI, 264 RU per FcγRIII (FcγR umani ad alta affinità) e 500 RU per FcγRIIa e FcγRIIb (FcγR umani a bassa affinità). Per ogni chip immobilizzato è stata lasciata in bianco una cella di flusso per la sottrazione di sfondo. I FcγR sono stati immobilizzati usando una concentrazione di 5 µg/ml in acetato di sodio pH 5 (ForteBio, 18-1069) e iniettati ad una portata di 10 µl/minuto in cicli di 15 secondi fino al raggiungimento del livello di immobilizzazione richiesto.

Per FcγRI e FcγRIII ad alta affinità, sono stati fatti fluire 200

5 $\mu\text{g/ml}$ di mAb o mAb² fittizio sul chip per 3 minuti ad una portata di 30 $\mu\text{l/minuto}$ e la dissociazione è stata seguita per 5 minuti. Il tampone di corsa era HBS-P (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioattivo P20 0,005% v/v, GE Healthcare, BR-1003-68). Per Fc γ RIIa e Fc γ RIIb a bassa affinità la concentrazione del mAb² fittizio è stata aumentata a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Il controllo positivo era un mAb con isotipo IgG1 wild type, che è stato confrontato con i controlli mAb di IgG1 e LALA e mAb monoclonali con isotipo IgG2 e IgG4 contro bersagli irrilevanti. Le celle di flusso sono state rigenerate iniettando idrossido di sodio 10 mM (VWR, 28244.262) ad una portata di 100 $\mu\text{l/minuto}$ per 30 secondi. L'analisi dei dati è stata eseguita con il software BiaEvaluation versione 3.2 RC1 mediante doppio riferimento contro la cella di flusso in bianco (senza Fc γ R immobilizzato) e sottraendo un ciclo di tampone dal mAb² di test. I risultati sono mostrati nella **Tabella 7**.

Tabella 7: Risposta di legame di Fcab anti-LAG-3 umani in formato mAb² fittizio (comprendente mutazione LALA come descritto sopra) ai recettori Fc γ umani mediante SPR

mAb/mAb ² fittizio	Risposta di legame alla fine dell'associazione (RU)			
	Fc γ RI	Fc γ RIII	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb
FS18-7-9	1,4	6,6	-9,8	-8,5
FS18-7-62	-0,9	0,7	-10	-8,5
FS18-7-78	-0,3	4,0	-10,7	-9,2

mAb/mAb ² fittizio	Risposta di legame alla fine dell'associazione (RU)			
	FcγRI	FcγRIII	FcγRIIa	FcγRIIb
mAb fittizio con LALA	2	8,0	-12,7	-9,6
IgG2	0	1,9	9,7	7,4
IgG4	9	3,1	4,3	15,1
mAb fittizio di IgG1	26	44	13	17,7

Tutti i mAb² fittizi testati (comprendenti tutti la mutazione LALA come esposto sopra) hanno mostrato un legame significativamente ridotto ai recettori Fcγ testati rispetto all'anticorpo di controllo (mAb fittizio con IgG1) senza la mutazione LALA, indicando che la mutazione LALA ha ridotto il legame del recettore Fcγ da parte di questi mAb² fittizi e pertanto si prevede che ridurrà l'attività di ADCC del mAb².

1.6 Blocco del legame di MHC di classe II a LAG-3

La capacità dei Fcab (contenenti la cerniera troncata; SEQ ID NO: 58) di bloccare l'interazione tra LAG-3 Fc umano o murino ricombinante e MHC umane di Classe II è stata studiata misurando il legame di LAG-3 Fc a cellule A375, una linea cellulare di melanoma che esprime MHC umane di Classe II. Cellule A375 (ATCC, CRL-1619) fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenenti il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-106) sono state staccate da palloni per coltura cellulare usando tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014) e

OC

seminate in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897) a 2×10^5 cellule/pozzetto. Per pellettare le cellule, le piastre sono state centrifugate a 1500 giri/minuto per 3 minuti a 4 °C. Le concentrazioni rilevanti di Fcab o mAb di controllo sono state incubate con 1 µg/ml di LAG-3 Fc (LAG-3-Fc umano di R&D Systems, 2319-L3-050 o LAG-3 Fc murino di R&D Systems, 3328-L3-050) in 100 µl di DMEM contenente il 10% di FBS per 1 ora a 4 °C. La miscela LAG-3/Fcab è stata aggiunta alle cellule A375 e incubata per 1 ora a 4 °C. Le cellule sono state lavate. L'anticorpo secondario (F(ab')₂ anti-Fc umano di capra coniugato con Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098 o coniugato (H+L) 488 di IgG anti-murina di capra, Life Technologies, A-1101) è stato diluito 1:1000 in PBS e 100 µl sono stati aggiunti alle cellule per 30 minuti a 4 °C (le piastre sono state tenute al buio). Le cellule sono state lavate una volta in PBS e risospese in 100 µl di PBS + 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). Le piastre sono state lette su un citometro BD FACSCanto II (BD Biosciences) e i dati sono stati analizzati usando il software FlowJo.

Entrambi i Fcab anti-LAG-3 murini erano in grado di inibire l'interazione di MHC di classe II umane con il LAG-3 murino, mentre il mAb anti-LAG-3 murino di controllo (C9B7W, 2B Scientific, BE0174-50MG) non ne era in grado (si veda la **Tabella 8**).

Tabella 8: Fcab anti-LAG-3 murini surrogati inibiscono il legame di LAG-3 murino a MHC di classe II

Fcab anti-LAG-3 murini surrogati e mAb di controllo anti-LAG-3 murino C9B7W	IC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	0,6
FS18-7-108-35	0,7
C9B7W	Nessun blocco

I Fcab anti-LAG-3 umani testati erano anche in grado di inibire l'interazione di MHC umane di classe II con LAG-3 umano con una potenza simile al mAb anti-LAG-3 umano di controllo (25F7).

Tabella 9: I Fcab anti-LAG-3 umani inibiscono il legame di LAG-3 umano a MHC di classe II

Fcab anti-LAG-3 umani e mAb anti-LAG-3 umano di controllo 25F7	IC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-33	2,6
FS18-7-108-78	2,4
25F7	3,6

0 Esempio 2: Preparazione e caratterizzazione di molecole di mAb e mAb²

2.1 Preparazione di mAb 84G09

2.1.1 Generazione di costrutti di DNA

Gli inserti di DNA codificanti per regioni variabili di catena

pesante e leggera di 84G09 sono stati ottimizzati per codone per l'espressione di mammiferi e sintetizzati mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA, USA). Gli inserti forniti nel vettore ospite sottoposto a elevata Amp per pJ sono stati subclonati in vettori di espressione pFS-hHC2.1-
5 G1m17(z) LALA (catena pesante di IgG contenente mutazione LALA) o pFS-hHC2.1-G1m17(z) (catena pesante di IgG senza mutazione LALA) e pFSHK1.0 (catena leggera kappa di IgG) tramite digestione di restrizione *EcoRI* e *NheI*.

La fedeltà del clonaggio è stata verificata mediante PCR su colonia
0 e successiva analisi di sequenziamento nucleotidico da parte di terzi (GATC Biotech).

2.1.2 Mantenimento delle cellule

Le cellule HEK293-6E (NRCC), sono state sub-coltivate in terreno F17 pre-scaldato (Invitrogen, A13835-01) integrato con 4 mM di GlutaMAX-
5 1 (Invitrogen, 35050-038), lo 0,1% di Pluronic F-68 (Invitrogen A13835-01) e 25 µg/ml di geneticina (Invitrogen, 10131-027). Le cellule sono state incubate a 37 °C, 140 giri/minuto, 5% di CO₂ e subcoltivate a 0,3x10⁶ cellule/ml in un regime di tre poi quattro giorni.

2.1.3 Trasfezione transitoria

0 Le cellule HEK293-6E sono state trasfettate transitoriamente usando PEIpro a 1 mg/ml (Polyplus, PPLU115). 24 ore prima della trasfezione le cellule sono state seminate a 0,8x10⁶ cellule/ml nel terreno di coltura. Per ogni 200 ml di coltura cellulare, è stata preparata una miscela di DNA miscelando 10 ml di Opti-MEMI scaldato (Invitrogen, 11058-021), 100
5 µg di DNA privo di endotossine codificante per la catena pesante e 100 µg di DNA privo di endotossine codificante per la catena leggera. La

miscela PEI è stata preparata miscelando 10 ml di Opti-MEMI scaldato e 200 µl di PEIpro e passando su vortex. La miscela di DNA è stata rapidamente aggiunta alla miscela PEI passata su vortex, miscelata mediante vortex pulsando 3 volte per 1 secondo, incubata 3 minuti a temperatura ambiente e aggiunta goccia a goccia alle cellule. 48 ore dopo la trasfezione, ad ogni pallone sono stati aggiunti 20 ml di F17 più integratori con lo 0,5% di Tryptone N1 (TekniScience Inc., 19553).

6 giorni dopo la trasfezione, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 4500 giri/minuto per 40 minuti. Il surnatante è stato poi filtrato con 0,22 µm di unità di filtro di polietersolfone (Millipore, SCGPU01RE, SCGPU02RE, SCGPU05RE, SCGPU11RE) e conservato a +4 °C fino alla purificazione.

2.1.4 Cromatografia della proteina A

I surnatanti chiarificati sono stati purificati usando colonne HiTrap MabSelect SuRe pre-impaccate da 5 ml (GE Healthcare, 11-0034-95) su un ÄKTAexplorer o ÄKTAexpress. In breve, le colonne sono state equilibrate con Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM a pH 7,0, materiale non legato lavato con lo stesso tampone a 5 ml/minuto. I prodotti sono stati eluiti con formiato di sodio 10 mM pH 3,0 a 5 ml/minuto. I campioni eluiti sono stati immediatamente sottoposti a scambio di tampone in PBS pH 7,4 usando colonne PD-10 (GE Healthcare, 17-0851-01) pre-equilibrate con PBS pH 7,4 secondo le istruzioni del produttore.

2.1.5 Misurazione della concentrazione del prodotto mediante spettrometria

L'assorbanza a 280 nm di ciascun prodotto purificato è stata misurata usando LabChip DS (PerkinElmer, 133089) con DropPlate 96 D+

(PerkinElmer, CLS135136). La concentrazione del prodotto è stata calcolata usando il coefficiente di estinzione (A280 di 1 mg/ml) calcolato usando il software VectorNTI Advance v11.5.4 (ThermoFisher Scientific, A13784)

5 2.1.6 Concentrazione del prodotto

Quando necessario, le frazioni purificate sono state concentrate usando Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 30K (Millipore, UFC803024). Dopo l'equilibratura della membrana di cellulosa rigenerata Ultracel con PBS pH 7,4 mediante centrifugazione 10 minuti a 3000 0 giri/minuto, i campioni sono stati caricati nell'unità da 4 ml e centrifugati a 3000 giri/minuto fino a raggiungere la concentrazione proteica desiderata.

2.1.6 Sterilizzazione dei filtri

I campioni finali sono stati filtrati usando filtri per siringa 5 Millex-GV PVDF pre-bagnati (Millipore, SLGV013SL).

2.2 Preparazione di mAb² contro LAG-3/PD-L1 umano

Le catene pesanti delle molecole di mAb² FS18-7-9/84G09 (SEQ ID NO 94 e 95), FS18-7-32/84G09 (SEQ ID NO 96 e 97), FS18-7-33/84G09 (SEQ ID NO 98 e 99), FS18-7-36/84G09 (SEQ ID NO 100 e 101), FS18-7-58/84G09 (SEQ 0 ID NO 102 e 103), FS18-7-62/84G09 (SEQ ID NO 104 e 105), FS18-7-65/84G09 (SEQ ID NO 106 e 107), FS18-7-78/84G09 (SEQ ID NO 108 e 109), FS18-7-88/84G09 (SEQ ID NO 110 e 111) e FS18-7-95/84G09 (SEQ ID NO 112 e 113) sono state preparate sostituendo i domini CH3 degli anticorpi monoclonali 84G09 (con e senza la mutazione LALA) con i domini CH3 dei Fcab specifici 5 per LAG-3 umano FS18-7-9, FS18-7-32, FS18-7-33, FS18-7-36, FS18-7-58, FS18-7-62, FS18-7-65, FS18-7-78, FS18-7-88 e FS18-7-95 all'interno dei

siti *XhoI* e *BamHI* presenti nella sequenza del dominio CH3 non modificato di IgG1 umana. La catena pesante del mAb² è stata co-trasfettata con la catena leggera di 84G09 (SEQ ID NO: 116) come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1. di cui sopra. I mAb² sono stati poi espressi e purificati come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra.

2.3 Preparazione di mAb² contro LAG-3 umano/fittizio

Il mAb anti-FITC (con e senza mutazione LALA) è stato preparato come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra usando le catene pesanti (SEQ ID NO 83 e 84; con e senza mutazione LALA) e la catena leggera (SEQ ID NO: 85) di mAb 4420.

Le catene pesanti delle molecole di mAb² FS18-7-9/4420 (SEQ ID NO 63 e 64), FS18-7-32/4420 (SEQ ID NO 65 e 66), FS18-7-33/4420 (SEQ ID NO 67 e 68), FS18-7-36/4420 (SEQ ID NO 69 e 70), FS18-7-58/4420 (SEQ ID NO 71 e 72), FS18-7-62/4420 (SEQ ID NO 73 e 74), FS18-7-65/4420 (SEQ ID NO 75 e 76), FS18-7-78/4420 (SEQ ID NO 77 e 78), FS18-7-88/4420 (SEQ ID NO 79 e 80) e FS18-7-95/4420 (SEQ ID NO 81 e 82) sono state preparate sostituendo i domini CH3 degli anticorpi monoclonali 4420 (con e senza la mutazione LALA) con i domini CH3 dei Fcab specifici per LAG-3 umano FS18-7-9, FS18-7-32, FS18-7-33, FS18-7-36, FS18-7-58, FS18-7-62, FS18-7-65, FS18-7-78, FS18-7-88 e FS18-7-95 all'interno dei siti *XhoI* e *BamHI* presenti nella sequenza del dominio CH3 non modificato di IgG1 umana. Le catene pesanti del mAb² sono state co-trasfettate con la catena leggera del mAb 4420 come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra. Le proteine sono state poi espresse e purificate come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra.

2.4 Preparazione del mAb² contro LAG-3/PD-L1 murino

Il mAb anti-PD-L1 murino (con e senza mutazione LALA) è stato preparato come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra usando la catena pesante (SEQ ID NO 122 e 123) e la catena leggera (SEQ ID NO: 119) del mAb S1.

La catena pesante delle molecole di mAb² FS18-7-108-29/S1 (SEQ ID NO 117 e 118) e FS18-7-108-35/S1 (SEQ ID NO 120 e 121) è stata preparata sostituendo i domini CH3 degli anticorpi monoclonali S1 (con e senza la mutazione LALA) con i domini CH3 dei Fcab specifici per LAG-3 murino FS18-7-108-29 e FS18-7-108-35 all'interno dei siti *XhoI* e *BamHI* presenti nella sequenza del dominio CH3 non modificato di IgG1 umana. La catena pesante del mAb² è stata co-trasfettata con la catena leggera di S1 come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra. Le proteine sono state poi espresse e purificate come descritto per il mAb 84G09 nella sezione 2.1 di cui sopra.

2.5 Affinità di legame e cinetica del mAb² per LAG-3 umano e PD-L1 umano

La proteina L (Thermo, 21189) è stata immobilizzata sulle celle di flusso 1 e 2 di un chip CM5 Serie S (GE Healthcare, BR-1005-30) mediante accoppiamento amminico (GE Healthcare, BR-1000-50) a una densità superficiale di 2000 RU seguendo le istruzioni del produttore per lo strumento BIAcore T200. Per il legame di LAG-3, i campioni di mAb² (tutti contenenti la mutazione LALA) sono stati catturati solo sulla cella di flusso 2 e LAG-3Fc umano (R&D Systems, 2319-L3) a 4 concentrazioni in una serie di diluizioni doppie a partire da 0,5 nM sono stati fatti fluire attraverso entrambe le celle di flusso 1 e 2 ad una portata di 30 µl/minuto. Il tempo di associazione era 3 minuti e il tempo di

dissociazione era 6 minuti. Il tampone di corsa era HBS-P (GE Healthcare, BR-1003-68). Entrambe le celle di flusso sono state rigenerate iniettando idrossido di sodio 10 mM (NaOH) ad una portata di 100 μ l/minuto per 20 secondi. I dati sono stati analizzati mediante doppio riferimento rispetto alla cella di flusso in bianco.

Per il legame di PD-L1, quattro concentrazioni in una serie di diluizioni doppie di PD-L1 Fc (R&D Systems, 156-B7), a partire da 40 nM, sono state fatte scorrere attraverso il mAb² catturato sullo stesso chip di proteina L. Tutte le altre condizioni erano uguali a quelle per il legame di LAG-3 (si veda sopra).

La cinetica di legame è stata adattata con un modello di Langmuir 1:1 per generare velocità di associazione (k_a) e di dissociazione (k_d) di legame. Le costanti di legame all'equilibrio (K_D) sono state calcolate dividendo la velocità di dissociazione per la velocità di associazione per ciascun campione. L'analisi dei dati è stata eseguita con il software BiaEvaluation versione 3.2. I risultati sono mostrati nelle **Tabelle 10 e 11**.

Tabella 10: Affinità di legame e cinetica del mAb² a LAG-3 umano come determinato mediante SPR

mAb ²	K_D (pM)	k_a (1/Ms) $\times 10^6$	k_d (1/s) \times 10^{-4}
84G09LALA	Nessun legame	-	-
FS18-7-09/84G09LALA	56	6,3	3,5

mAb ²	K _D (pM)	k _a (1/Ms) x 10 ⁶	k _d (1/s) x 10 ⁻⁴
FS18-7-32/84G09LALA	49	5,6	2,8
FS18-7-33/84G09LALA	43	4,2	1,8
FS18-7-36/84G09LALA	38	4,4	1,7
FS18-7-62/84G09LALA	36	5,4	2,0
FS18-7-65/84G09 LALA	39	5,9	2,3
FS18-7-78/84G09 LALA	29	4,8	1,4

Tabella 11: Affinità di legame e cinetica del mAb² a PD-L1 umano come determinato mediante SPR

mAb ²	K _D (nM)	k _a (1/Ms) x10 ⁵	k _d (1/s) x 10 ⁻⁴
84G09LALA	1,2	3,8	4,6
FS18-7-09/84G09LALA	1,0	3,8	3,9
FS18-7-32/84G09LALA	1,0	3,4	3,2
FS18-7-33/84G09LALA	1,1	3,7	4,2
FS18-7-36/84G09LALA	3,5	1,6	5,6
FS18-7-62/84G09LALA	1,3	1,7	2,2
FS18-7-65/84G09	1,1	1,3	1,4

mAb ²	K _D (nM)	k _a (1/Ms) x10 ⁵	k _a (1/s) x 10 ⁻⁴
LALA			
FS18-7-78/84G09	1,0	1,0	1,0
LALA			

Le affinità di legame per PD-L1 umano e LAG-3 umano erano comparabili per tutti i mAb² testati. Le affinità di legame di mAb² per PD-L1 umano erano paragonabili a 84G09, indicando che l'introduzione del sito di legame di LAG-3 nel dominio CH3 non influenzava il legame di PD-L1.

2.6 Legame simultaneo di mAb² a LAG-3 umano e PD-L1 umano

La capacità di mAb² (FS18-7-09/84G09, FS18-7-32/84G09, FS18-7-33/84G09, FS18-7-36/84G09, FS18-7-62/84G09, FS18-7-65/84G09 e FS18-7-78/84G09 tutti con la mutazione LALA) di legarsi simultaneamente a LAG-3 e PD-L1 è stata testata mediante SPR. PD-L1 Fc umano (R&D Systems, 156-B7) è stato immobilizzato sulla cella di flusso 2 di un chip CM5 Serie S (GE Healthcare, BR-1005-30) a una densità superficiale di 150 RU seguendo le istruzioni del produttore. La cella di flusso 1 è stata attivata e disattivata senza alcuna proteina immobilizzata per sottrazione di sfondo. Per ciascun campione, 10 µg/ml di mAb² sono stati fatti fluire attraverso le celle di flusso 1 e 2, ad una portata di 10 µl/minuto per 3 minuti. Successivamente, 40 nM di LAG-3 Fc (R&D Systems, 2319-L3) sono stati fatti fluire attraverso entrambe le celle di flusso 1 e 2 ad una portata di 10 µl/minuto per 3 minuti. Per ciascuna fase di

legame è stata seguita la dissociazione per 3 minuti. Il chip sensore è stato rigenerato dopo ogni ciclo con un'iniezione di 15 secondi di NaOH 25 mM ad una portata di 100 µl/minuto.

Tutti i mAb² testati erano in grado di legarsi simultaneamente a LAG-3 e PD-L1. Il mAb anti-PD-L1 progenitore, 84G09, si lega solo a PD-L1.

2.7. Legame simultaneo di mAb² surrogato a LAG-3 murino e a PD-L1 murino

La capacità dei due mAb² murini surrogati (FS18-7-108-29/S1 e FS18-7-108-35/S1, entrambi contenenti la mutazione LALA) di legarsi simultaneamente a LAG-3 murino e a PD-L1 murino è stata testata mediante SPR su un BIAcore 3000 (GE Healthcare). PD-L1Fc murino (R&D Systems, 1019-B7-100) è stato immobilizzato sulla cella di flusso 4 di un chip CM5 a una densità superficiale di 830 RU secondo le istruzioni del produttore. La cella di flusso 3 è stata immobilizzata con 820 RU di Fc umano (R&D system, 110-HG) per la sottrazione di sfondo. Per ciascun campione, 50 nM di mAb² sono stati fatti fluire attraverso le celle di flusso 1 e 2, ad una portata di 20 µl/minuto per 150 secondi. Successivamente, 50 nM di LAG-3Fc murino (R&D Systems, 3328-L3-050) sono stati fatti fluire attraverso entrambe le celle di flusso 3 e 4 ad una portata di 20 µl/min per 150 secondi. Per ciascuna fase di legame è stata seguita la dissociazione per 3 minuti. Il chip sensore è stato rigenerato dopo ogni ciclo con 2 x 10 µl di NaOH 50 mM. Entrambi i mAb² testati erano in grado di legarsi simultaneamente a LAG-3 murino e a PD-L1 murino e sono pertanto surrogati adatti per il mAb² contro LAG-3/PD-L1 umano.

2.8 Legame ai recettori Fcγ umani da parte di mAb² comprendente mutazione

LALA

I recettori Fc γ umani sono stati immobilizzati su un chip CM5 a una densità superficiale di approssimativamente 200 RU per Fc γ RI (R&D Systems, 1257-FC) e Fc γ RIIIa (R&D Systems, 4325-FC) e approssimativamente 500 RU per Fc γ RIIa (R&D Systems, 1330-CD) e Fc γ RIIb/c (R&D Systems, 1875-CD), secondo le istruzioni del produttore per lo strumento BIAcore3000. Per Fc γ RI e Fc γ RIIIa, 100 μ g/ml di mAb o mAb² sono stati fatti fluire attraverso il chip per 3 minuti ad una portata di 10 μ l/minuto e la dissociazione è stata seguita per 5 minuti. Il tampone di corsa era PBS (Lonza, BE17-516F) + tensioattivo P20 allo 0,05% (v/v) (GE Healthcare, BR-1000-54). Il controllo positivo era mAb 4420 di IgG1 wild-type. Sono stati inclusi come punti di riferimento mAb di IgG2 e IgG4 monoclonali contro bersagli irrilevanti (20H4 e MOR7490) e IgG1 murina (Sigma, P5305). Non è stata necessaria alcuna rigenerazione a causa delle velocità di dissociazione rapide dei complessi leganti. Per il test di Fc γ RIIa e Fc γ RIIb/c la concentrazione di mAb² è stata aumentata a 500 μ g/ml per compensare il legame più debole a questi due recettori. I risultati sono mostrati nella **Tabella 12**.

Tabella 12: Risposta di legame del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 ai recettori

Fc γ umani come determinato mediante SPR

mAb/mAb ²	Risposta di legame alla fine dell'associazione (RU)			
	Fc γ RI	Fc γ RIII	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb/ c
FS18-7-9/84G09	<1	<5	<1	<2

mAb/mAb ²	Risposta di legame alla fine dell'associazione (RU)			
	FcγRI	FcγRIII	FcγRIIIa	FcγRIIb/ c
LALA				
FS18-7-33/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
FS18-7-62/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
FS18-7-78/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
mAb 84G09 con LALA	<1	<5	<1	<2
IgG2	<1	<5	9	<2
IgG4	8	<5	8	9
mAb 4420 di IgG1	30	28	29	18
IgG1 murina	<1	<5	7	<2

Come previsto, la variante LALA introdotta nel mAb o mAb² riduce la capacità di queste molecole di legare recettori Fcγ umani.

2.9 Legame di mAb² a cellule che esprimono LAG-3 umano e di cinomolgo

5 La sequenza di LAG-3 umano (SEQ ID NO: 126) o la sequenza di LAG-3 di cinomolgo (SEQ ID NO: 128) sono state subclonate in vettore pcDNA5FRT (Life Technologies, V6010-20) usando la digestione di restrizione KpnI

(NEB, R0142) e Not1 (NEB, R0146). Il vettore è stato poi trasformato nella linea di cellule HEK 293 Flp-In T-REx (Life Technologies, R780-07) usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, 11668-019). Cellule HEK 293 Flp-In T-REx trasformate sono state fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di blasticidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) per 3-4 settimane fino a quando non sono emerse colonie di cellule trasformate stabilmente. Queste colonie sono state amplificate in presenza di 1 µg/ml di doxiciclina (Sigma, D9891) e testate per l'espressione di LAG-3 che è stata confermata mediante citometria a flusso.

L'affinità dei mAb² (tutti contenenti la mutazione LALA) per LAG-3 umano o di cinomolgo espresso da cellula è stata determinata usando la citometria a flusso. Le cellule HEK che esprimono LAG-3 umano o di cinomolgo fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di Blastidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) e 1 µg/ml di Doxiciclina (Sigma, D9891) sono state staccate dai palloni per coltura tissutale usando tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014) e seminate in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897) a 2×10^5 cellule/pozzetto. Per pellettare le cellule, le piastre sono state centrifugate a 1500 giri/minuto per 3 minuti a 4 °C. Una serie di diluizioni del mAb² (o mAb di controllo) è stata incubata con le cellule in un volume di 100 µl per 1 ora a 4 °C. Le piastre sono state lavate e l'anticorpo secondario (Anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-

546-098) è stato diluito 1:1000 in PBS e 100 µl sono stati aggiunti alle cellule per 30 minuti a 4 °C (le piastre sono state tenute al buio). Le piastre sono state lavate e poi le cellule sono state risospese in 100 µl di PBS contenente 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). Le piastre sono state lette usando un citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488 nm/530/30). I dati sono stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. Le piastre sono state lette su un citometro BD FACSCanto II (BD Biosciences) e i dati sono stati analizzati usando FlowJo. I risultati sono mostrati nella **Tabella 13**.

Tabella 13: Affinità di legame del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 a cellule HEK che esprimono LAG-3 umano o di cinomolgo come determinato mediante citometria a flusso

	LAG-3 umano		LAG-3 di cinomolgo	
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	3,179	da 2,311 a 4,372	29,9	da 22,16 a 40,35
FS18-7- 62/84G09LALA	4,079	da 2,736 a 6,083	26,37	da 15,80 a 44,02
FS18-7- 78/84G09LALA	2,526	da 1,474 a 4,329	24,75	da 19,31 a 31,73

	LAG-3 umano		LAG-3 di cinomolgo	
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.
25F7	4,192	da 2,791 a 6,297	156,5	da 107,3 a 228,2

I risultati confermano il legame del mAb² a LAG-3 umano e di cinomolgo espresso su cellule HEK. Per quanto riguarda i valori calcolati di EC₅₀, il mAb² testato mostra un legame migliore o uguale al LAG-3 umano e un legame almeno due volte migliore al LAG-3 di cinomolgo rispetto all'anticorpo anti-LAG-3 di controllo 25F7. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con altre proteine espresse sulla superficie della linea di cellule HEK.

2.10 Legame di mAb² a cellule che esprimono PD-L1 umano e di cinomolgo

La sequenza di PD-L1 umano (SEQ ID NO: 129) o la sequenza di PD-L1 di cinomolgo (SEQ ID NO: 131) sono state subclonate in vettore pcDNA5FRT (Life Technologies, V6010-20) usando la digestione di restrizione KpnI (NEB, R0142) e NotI (NEB, R0146). Il vettore è stato poi trasformato nella linea di cellule HEK 293 Flp-In T-REx (Life Technologies, R780-07) usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, 11668-019). Cellule HEK 293 Flp-In T-REx trasformate sono state fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di blasticidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) per 3-4

settimane fino a quando non sono emerse colonie di cellule trasformate stabilmente. Queste colonie sono state amplificate in presenza di 1 µg/ml di doxiciclina (Sigma, D9891) e l'espressione di LAG-3 è stata confermata mediante citometria a flusso.

5 L'affinità dei mAb² (tutti contenenti la mutazione LALA) che si legano a PD-L1 umano o di cinomolgo espresso da cellula o a (cellule non trasformate) progenitrici è stata determinata usando la citometria a flusso. Le cellule HEK che esprimono PD-L1 umano o di cinomolgo fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS
0 (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di Blastomicina (Melford Laboratories Ltd, B1105) e 1 µg/ml di Doxiciclina (Sigma, D9891) sono state staccate dai palloni per coltura tissutale usando tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014) e seminate in piastre a 96
5 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897) a 2x10⁵ cellule/pozzetto. Per pellettare le cellule, le piastre sono state centrifugate a 1500 giri/minuto per 3 minuti a 4 °C. Una serie di diluizioni del mAb² (o mAb di controllo) è stata incubata con le cellule in un volume di 100 µl per 1 ora a 4 °C. Le piastre sono state lavate e l'anticorpo secondario
0 (Anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098) è stato diluito 1:1000 in PBS e 100 µl sono stati aggiunti alle cellule per 30 minuti a 4 °C (le piastre sono state tenute al buio). Le piastre sono state lavate, poi le cellule sono state risospese in 100 µl di PBS contenente 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). Le piastre sono state lette usando un
5 citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488

nm/530/30). I dati sono stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. Le piastre sono state lette su un citometro BD FACSCanto II (BD Biosciences) e i dati sono stati analizzati usando FlowJo. I risultati sono mostrati nella **Tabella**

5 **14.**

Tabella 14: Affinità di legame del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 alle cellule HEK che esprimono PD-L1 umano o di cinomolgo come misurato mediante citometria a flusso

	HEK PD-L1 umano		PD-L1 di cinomolgo	
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.
84G09	3,107	da 2,230 a 4,331	1,641	da 1,244 a 2,164
FS18-7- 09/84G09	3,19	da 2,208 a 4,610	1,674	da 1,393 a 2,012
FS18-7- 09/84G09	3,51	da 2,570 a 4,794	1,814	da 1,503 a 2,189
FS18-7- 33/84G09	3,448	da 2,436 a 4,881	1,895	da 1,566 a 2,292
FS18-7- 32/84G09	3,816	da 2,749 a 5,298	1,984	da 1,644 a 2,393
FS18-7- 58/84G09	3,775	da 2,957 a 4,820	1,861	da 1,541 a 2,247

	HEK PD-L1 umano		PD-L1 di cinomolgo	
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.
FS18-7- 33/84G09	3,225	da 2,214 a 4,700	1,733	da 1,397 a 2,150
FS18-7- 65/84G09	3,999	da 2,782 a 5,750	1,845	da 1,455 a 2,339
FS18-7- 36/84G09	3,907	da 2,844 a 5,367	1,999	da 1,580 a 2,528
FS18-7- 88/84G09	3,492	da 2,541 a 4,800	1,814	da 1,464 a 2,247
FS18-7- 58/84G09	3,907	da 2,998 a 5,093	2,033	da 1,622 a 2,550
84G09 (progenitore)	3,051	da 2,181 a 4,267	1,959	da 1,515 a 2,533

Tutti i mAb² contro LAG-3/PD-L1 testati si sono legati a PD-L1 umano e PD-L1 di cinomolgo con una EC₅₀ vicina a quella del mAb 84G09, dimostrando che l'affinità di legame di PD-L1 non è stata influenzata dall'introduzione del sito legante LAG-3 nel dominio CH3 del mAb².

2.11 Legame del mAb² surrogato murino a cellule che esprimono LAG-3 murino o PD-L1 murino

La sequenza di LAG-3 murino (SEQ ID NO: 127) o la sequenza di PD-L1 murino (SEQ ID NO: 130) sono state subclonate in vettore pcDNA5FRT

(Life Technologies, V6010-20) usando la digestione di restrizione KpnI (NEB, R0142) e NotI (NEB, R0146). Il vettore è stato poi trasformato nella linea di cellule HEK 293 Flp-In T-REx (Life Technologies, R780-07) usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, 11668-019). Cellule 5 293 Flp-In T-REx trasformate sono state fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di blasticidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) per 3-4 settimane fino a quando non sono emerse colonie di cellule trasformate 0 stabilmente. Queste colonie sono state amplificate in presenza di 1 µg/ml di doxiciclina (Sigma, D9891) e l'espressione di LAG-3 o PD-L1 è stata confermata mediante citometria a flusso.

L'affinità dei mAb² (tutti contenenti le mutazioni LALA) che si legano al LAG-3 murino o al PD-L1 murino espresso dalla cellula è stata 5 determinata usando la citometria a flusso. Le cellule HEK che esprimono LAG-3 murino o PD-L1 murino fatte crescere in DMEM (Life Technologies, 61965-026) contenente il 10% di FBS (Life Technologies, 10270-1-6), 100 µg/ml di igromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475), 15 µg/ml di Blastocidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) e 1 µg/ml di Doxiciclina 0 (Sigma, D9891) sono state staccate dai palloni per coltura tissutale usando tampone di dissociazione cellulare (Life Technologies, 13151-014) e seminate in piastre a 96 pozzetti con fondo a V (Costar, 3897) a 2x10⁵ cellule/pozzetto. Per pellettare le cellule, le piastre sono state centrifugate a 1500 giri/minuto per 3 minuti a 4 °C. Una serie di 5 diluizioni del mAb² (o mAb di controllo) è stata incubata con le cellule in un volume di 60 µl per 1 ora a 4 °C. Le piastre sono state lavate e

l'anticorpo secondario (anti-Fc-488 umano, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098 per mAb² o IgG anti-ratto (H+L), Alexa Fluor 488, ThermoFisher, A-11006 per il controllo anti-LAG-3, C9B7W) è stato diluito 1:1000 in PBS e 50 µl sono stati aggiunti alle cellule per 30 minuti a 4 °C (le piastre sono state tenute al buio). Le piastre sono state lavate, poi le cellule sono state risospese in 50 µl di FACS Cell Fix (BD Bioscience, 340181) per 15 minuti, poi lavate e risospese in 100 µl di PBS contenente 1 µg/ml di DAPI (Biotium, 40043). Le piastre sono state lette usando un citometro a flusso Canto II (BD Bioscience). Le cellule morte sono state escluse ed è stata misurata la fluorescenza nel canale FITC (488 nm/530/30). I dati sono stati adattati usando logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. Le piastre sono state lette su un citometro BD FACSCanto II (BD Biosciences) e i dati sono stati analizzati usando FlowJo. I risultati sono mostrati nella **Tabella 15**.

Tabella 15: Affinità di legame del mAb² surrogato anti-LAG-3/PD-L1 murino a cellule HEK che esprimono LAG-3 murino o PD-L1 murino mediante citometria a flusso

	HEK LAG-3 murino		HEK PD-L1 murino	
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.
C9B7W	27	da 12,27 a 58,04	N/D	-
FS18-7-108-	2,27	da 1,064 a	11,9	da 7,627 a

	HEK LAG-3 murino		HEK PD-L1 murino	
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.
29/S1		4,857		18,68
FS18-7-108- 29/4420	2,29	da 1,256 a 4,164	N/D	-
FS18-7-108- 35/S1	3,84	da 2,126 a 6,926	12,3	da 8,873 a 17,16
FS18-7-108- 35/4420	2,38	da 0,7819 a 7,239	N/D	-

Il mAb² surrogato era in grado di legarsi al LAG-3 murino espresso dalle cellule e al PD-L1 murino espresso dalle cellule. L'affinità di legame del mAb² surrogato a LAG-3 murino espresso da cellule è approssimativamente la stessa dell'affinità del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano a LAG-3 umano (2,3-3,8 nM rispetto a 2,5-4,2 nM) e l'affinità di legame del mAb² surrogato al PD-L1 murino espresso da cellule rientra 3 volte nell'affinità del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano al PD-L1 umano (11,9-12,3 nM rispetto a 3,1-4,0 nM), dimostrando che questi mAb² sono surrogati adatti per il mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano per l'uso in studi *in vivo* nei topi.

Esempio 3: Attività delle molecole di mAb² nei saggi di attivazione delle cellule T e in un saggio SEB

3.1 Saggio di attivazione delle cellule T

Per lo screening funzionale del mAb² è stato usato un saggio di

rilascio di IL-2 basato sulle linee cellulari di ibridoma di linfociti B LK35.2 e linfociti T OVA DO11.10. Il rilascio di IL-2 è un marker dell'attivazione delle cellule T. Le cellule T, che esprimono PD-1 murino endogeno, sono state trasfettate con vettore vuoto (pLVX) o costruito
5 LAG-3 umano. Le cellule B sono state trasfettate con vettore vuoto (pLVX) o costruito PD-L1 umano.

Tre combinazioni di queste quattro linee cellulari sono state usate fianco a fianco per testare l'attivazione dei linfociti T da parte del mAb²:

- 0 • DO11.10 pLVX + LK35.2 hPD-L1 per attività anti-PD-L1;
- DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 pLVX per attività anti-LAG-3;
- DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 hPD-L1 per attività simultanea anti-LAG-3/anti-PD-L1.

Tutti i mAb² (tutti contenenti la mutazione LALA) sono stati testati
5 due volte in questo saggio di attivazione di cellule T. La reattività crociata con LAG-3 e PD-L1 di cinomolgo è stata testata in un saggio di attivazione funzionale delle cellule T usando cellule che sovraesprimono i bersagli di cinomolgo (cPD-L1 e cLAG-3).

Produzione di linee di cellule T che sovraesprimono LAG-3

0 La metodologia di trasduzione lentivirale è stata usata per generare cellule DO11.10 (National Jewish Health) che sovraesprimono LAG-3 umano, di cinomolgo o murino usando il sistema di impaccamento Lenti-X HTX (Cat. N. 631249). Il vettore di espressione Lenti-X (pLVX) (Cat. N. 631253), contenente cDNA di LAG-3 murino (SEQ ID NO: 127), cDNA di LAG-
5 3 umano (SEQ ID NO: 126) o cDNA di LAG-3 di cinomolgo (SEQ ID NO: 128), è stato co-trasfettato con una miscela di impaccamento Lenti-X HTX nella



linea di cellule 293T Lenti-X (Cat. N. 632180) per generare virus. La linea cellulare DO11.10 è stata trasdotta usando i vettori lentivirali prodotti con il sistema di impaccamento Lenti-X HTX.

Produzione di cellule presentanti l'antigene che sovraesprimono PD-L1

5 La metodologia di trasduzione lentivirale è stata usata per generare linfoma a cellule B LK35.2 (ATCC, HB-98) che sovraesprime PD-L1 umano, di cinomolgo o murino usando il sistema di impaccamento Lenti-X HTX (Cat. N. 631249). Il vettore di espressione Lenti-X (pLVX) (Cat. N. 631253), contenente cDNA di PD-L1 murino (SEQ ID NO: 130), cDNA di PD-
0 L1 umano (SEQ ID NO: 129 o cDNA di PD-L1 di cinomolgo (SEQ ID NO: 131), è stato co-trasfettato con una miscela di impaccamento Lenti-X HTX nella linea di cellule 293T Lenti-X (Cat. N. 632180) per generare virus. La linea cellulare LK35.2 è stata trasdotta usando i vettori lentivirali prodotti con il sistema di impaccamento Lenti-X HTX.

5 *Terreni e peptide*

Terreno di coltura cellulare: DMEM (Gibco, 61965-026) 10% di FBS (Gibco, 10270-106), piruvato di sodio 1 mM (Gibco, 11360-070), 1 µg/ml di puromicina (Gibco, A11138-03) Terreno sperimentale: terreno di coltura DO11.10 completo senza puromicina. Peptide OVA (MW= 1773,9 Da):

0 H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH (Pepsan)

Cellule:

- DO11.10 hLAG-3: Ibridoma a cellule T DO11.10 trasdotto con un vettore lentivirale per sovraesprimere LAG-3 umano;
- DO11.10 pLVX: Ibridoma a cellule T DO11.10 trasdotto con un vettore
5 lentivirale vuoto;
- DO11.10 cLAG-3: Ibridoma a cellule T DO11.10 trasdotto con un vettore

lentivirale per sovraesprimere LAG-3 di cinomolgo.

- LK 35.2 hPD-L1: Ibridoma a cellule B trasdotto con un vettore lentivirale contenente hPD-L1 per sovraesprimere PD-L1 umano;
- LK 35.2 PLVX: Ibridoma a cellule B trasdotto con un vettore
5 lentivirale vuoto (pLVX);
- LK 35.2 cPD-L1: Ibridoma a cellule B trasdotto con un vettore
0 lentivirale per sovraesprimere PD-L1 di cinomolgo.

Le cellule DO11.10 (cellule DO11.10 pLVX o cellule DO11.10 hLAG-3)
a $0,3 \times 10^6$ cellule/ml sono state miscelate a un rapporto di 1:1 con
0 anticorpi a una 3 x concentrazione finale. Anticorpi e cellule DO11.10
sono stati incubati a 37 °C e 5% di CO₂ per 1 ora. Le cellule LK 35.2
(sia pLVX sia PD-L1-pLVX) sono state incubate su terreni sperimentali
di 3×10^5 cellule/ml con il peptide OVA a 1,5 µM per 30 minuti. Cellule
LK 35,2 + OVA sono stati aggiunti miscela di cellule DO11.10/trattamento
5 in un rapporto di 1:2 nelle seguenti combinazioni:

Schermo funzionale umano

DO11.10 pLVX + LK35.2 hPD-L1,

DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 pLVX,

DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 hPD-L1;

0 Schermo di reattività crociata in cinomolgo

DO11.10 pLVX + LK35.2 cPD-L1,

DO11.10 cLAG-3 + LK35.2 pLVX,

DO11.10 cLAG-3 + LK35.2 cPD-L1;

Le cellule sono state incubate a 37 °C, CO₂ al 5% per 24 ore. I
5 surnatanti sono stati raccolti e saggiati con il kit ELISA IL-2 murino
(eBioscience, 88-7024-88 o R&D systems, SM2000) seguendo le istruzioni

del produttore. Le piastre sono state lette a 450 nm usando il lettore per piastre con il software Gen5, BioTek. I valori di assorbanza di 570 nm sono stati sottratti da quelli di 450 nm (Correzione). La curva standard per il calcolo della concentrazione di citochine era basata sull'adattamento della curva logistica a quattro parametri (Gen5 Software, BioTek). La concentrazione di mIL-2 è stata tracciata rispetto alla concentrazione logaritmica di Fcab o mAb e le curve risultanti sono state adattate usando l'equazione logaritmo (agonista) rispetto alla risposta in GraphPad Prism. La **Tabella 16** mostra i valori di EC₅₀ e il rilascio massimo di IL-2 del mAb² e dei mAb di controllo, calcolati come percentuale del controllo (84G09 + 25F7). La **Figura 2A-F** mostra grafici rappresentativi del rilascio di IL-2 dal pannello di linee cellulari trattate con FS18-7-9/84G09, FS18-7-62/84G09, o FS18-7-78/84G09, e controlli. Nel saggio di attivazione delle cellule T con entrambi i bersagli presenti (DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 hPD-L1), il rilascio di IL-2 è stato indotto solo quando entrambi i LAG-3 e PD-L1 sono stati inibiti, ad esempio quando è stato usato il mAb² o una combinazione di anticorpi contro LAG-3 e PD-L1. Pertanto il mAb² ha benefici rispetto a un singolo agente da solo. Nei saggi con solo LAG-3 (DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 pvlx) o PD-L1 (DO11.10 pvlx + LK35.2 PD-L1) il mAb² ha mostrato un'attività simile ai singoli agenti nell'inibire questi bersagli, dimostrando che il mAb² è l'unica molecola singola in grado di portare all'attivazione delle cellule T in presenza di LAG-3, PD-L1 o LAG-3+PD-L1.

Tabella 16: EC₅₀ e rilascio massimo di IL2 (come calcolato dalla percentuale di rilascio di IL2 rispetto al controllo - 84G09+25F7) per nove mAb²

mAb ² /mAb di controllo	MEDIA	DS	MEDIA	DS
	EC ₅₀		Rilascio massimo di IL2 calcolato come % di ctrl (84G09+25F7)	
FS 18-7 - 09/84G09LALA	0,75	0,20	65,89	24,04
FS18-7- 33/84G09LALA	0,82	0,35	63,95	36,56
FS18-7- 78/84G09LALA	0,82	0,38	64,39	39,28
FS18-7- 62/84G09LALA	0,65	0,02	58,97	18,13
FS18-7- 65/84G09LALA	0,81	0,20	70,25	2,22
FS18-7- 95/84G09LALA	1,10	-	79,77	-
FS18-7- 32/84G09LALA	1,19	0,00	82,94	14,67
FS 18-7 -	1,05	0,32	71,56	8,83

mAb ² /mAb di controllo	MEDIA	DS	MEDIA	DS
	EC ₅₀		Rilascio massimo di IL2 calcolato come % di ctrl (84G09+25F7)	
36/84G09LALA				
FS18-7- 58/84G09LALA	1,16	0,21	79,40	0,10
84G09LALA + 25F7	1,32	0,25	100,00	

Uno dei mAb² (FS18-7-9/84G09 contenente la mutazione LALA) è stato testato per la reattività crociata funzionale di cinomolgo nel saggio di attivazione delle cellule T DO11.1-/LK35.2. La **Figura 3 A-C** mostra i risultati nel pannello di tre saggi basati su cellule. FS18-7-9/84G09 è stato in grado di indurre l'attivazione delle cellule T in presenza di sia cLAG-3 + cPD-L1 sia cLAG-3 o cPD-L1 da soli, indicando che i mAb² sono funzionalmente cross-reattivi per cinomolgo e quindi adatti per l'uso in studi di sicurezza basati su primati.

3.2 Saggio con enterotossina B stafilococcica

Tre mAb² (tutti contenenti la mutazione LALA) sono stati testati nel saggio con enterotossina B stafilococcica basato su PBMC umane (saggio SEB). L'enterotossina B stafilococcica è un superantigene e si lega alle molecole MHC di classe II sulle cellule presentanti l'antigene (APC) e sulla catena $\nu\beta$ del recettore delle cellule T (TCR), causando l'attivazione aspecifica delle cellule T e il rilascio di citochine. Non

c'è bisogno che l'antigene sia presente per vedere l'attivazione delle cellule T. Il saggio SEB usa cellule umane stimolate (PBMC) con livelli fisiologici di inibitori del checkpoint, e può essere usato per confermare che l'attivazione delle cellule T è potenziata dal mAb² in un sistema umano. Tre mAb² sono stati testati nel sistema SEB con cellule provenienti da quattro diversi donatori.

Generazione di cellule T espanse

Le PMBC sono state isolate dai coni leucocitari mediante separazione su gradiente di Ficoll. Le cellule T CD4⁺ sono state isolate usando il kit di isolamento delle cellule T CD4⁺ umane (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-533) secondo le istruzioni del produttore. Le Dynabead con attivatore delle cellule T CD3/CD28 umane (Life technologies, 11131D) sono state risospese mediante vortex. Le perle sono state trasferite in una provetta sterile da 15 ml e sono stati aggiunti 10 ml di RPMI (Life Technologies, 61870044) con il 10% di FBS (Life Technologies, 10270106) e 1 x Penicillina-Streptomicina (Life Technologies, 15140122) per lavare le Dynabead. Il surnatante è stato eliminato. La quantità richiesta di cellule T CD4⁺ a 1,0 x10⁶ cellule/ml in RPMI con il 10% di FBS e 1x soluzione di streptomicina-penicillina e 50 UI/ml di IL2 umana ricombinante (Peprotech, 200-02-50 ug) con rapporto perla/cellula di 3:1 è stata trasferita in pallone T75 (Greiner Bio-one, 690195) e incubata a 37 °C + CO₂ al 5%. Dopo 3 giorni le cellule sono state delicatamente risospese e contate. La densità cellulare è stata mantenuta tra 0,8-1 x 10⁶ cellule/ml aggiungendo terreno fresco (RPMI-10% di FBS + Soluzione di streptomicina-penicillina 1X + 50 UI/ml di rhuIL2) secondo necessità. Il giorno 7 o 8, le perle CD3/28 sono state rimosse e le cellule T CD4⁺

sono state fatte riposare per tutta la notte a 1×10^6 cellule/ml di terreno fresco RPMI-10% di FBS + 1X Soluzione di Penicillina-Streptomicina con 10 UI/ml di rhuIL2 ridotta. Le cellule sono state conservate congelate fino a quando non è stato necessario.

5 *Generazione di MoIDC*

I monociti intatti sono stati isolati dalle PBMC umane usando il kit di isolamento dei monociti Pan umani, (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-537) seguendo le istruzioni del produttore. I monociti sono stati differenziati in iDC usando il terreno di differenziazione con Mo-DC
0 umane (Miltenyi Biotec Ltd, 130-094-812) seguendo le istruzioni del produttore.

Saggio SEB

Le cellule T espanse sono state scongelate un giorno prima dell'esperimento, lavate con terreno AIM (Gibco, 12055-091) e incubate
5 a 37 °C, 5% di CO₂ per una notte a 1×10^6 cellule/ml nel terreno AIM. 2 µM di concentrazione di ciascun anticorpo/miscela sono stati preparati in DPBS (Gibco, 14190-169) e diluiti in terreno 1:10 (30 µl + 270 µl) per ottenere 200 nM. In una piastra a 96 pozzetti, diluizioni seriali sono state effettuate a 1:10 (30 µl + 270 µl di terreno sperimentale;
0 2x concentrazione finale). Le MoIDC sono state scongelate, lavate con terreno AIM e miscelate con cellule T dello stesso donatore in un rapporto di 1:10 (5 ml di iDC a 2×10^5 cellule/ml sono stati combinati con 5 ml di cellule T a 2×10^6 cellule/ml). 20 µl di SEB (Sigma, S4881) a 0,1 µg/ml sono stati aggiunti a 10 ml delle cellule. In una piastra a
5 96 pozzetti con fondo rotondo, 100 µl della miscela cellula/SEB sono stati aggiunti a 100 µl della diluizione dell'anticorpo, dando un

rapporto di 10^4 cellule iDC a 10^5 cellule T con 0,1 ng/ml di SEB in 200 μ l di terreno AIM per pozzetto con concentrazioni finali di anticorpo di 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 nM. Le cellule sono state incubate a 37 °C, 5% di CO₂ per 3 giorni. I surnatanti sono stati raccolti e saggiati immediatamente con il kit ELISA IFN γ umano (R&D Systems, PDIF50) o congelati a -20 °C per un'ulteriore analisi. Il saggio è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore del kit usando surnatanti diluiti 1:30 con PBA (DPBS, 2% di BSA (Sigma, A7906-100G)). La concentrazione di IFN γ umano è stata tracciata rispetto alla concentrazione logaritmica di mAb² o mAb e le curve risultanti sono state adattate usando l'equazione logaritmo (agonista) rispetto alla risposta nel software GraphPad Prism. La **Tabella 17** mostra i valori di EC₅₀ e l'intervallo del rilascio di IFN γ nel saggio SEB con cellule provenienti da quattro diversi donatori di cellule (donatori da A a D). La **Figura 4** mostra un grafico rappresentativo del saggio SEB con un singolo donatore. In tutti e sei i saggi il mAb² contro LAG-3/PD-L1 e la combinazione del mAb² contro LAG-3/FITC + 84G09LALA hanno mostrato una maggiore attivazione rispetto al mAb 84G09LALA da solo, mentre quando sono stati saggiati il mAb² LAG-3/FITC o il mAb 4420 essi non hanno mostrato un'attivazione significativa. I risultati del saggio SEB confermano pertanto i risultati del saggio D011.10/LK35.2 in un sistema più fisiologico.

Tabella 17. Valori di EC₅₀ calcolati per sei mAb² sulla base di sei saggi SEB con 4 donatori di cellule diversi.

Saggio 1 Donatore A				
	EC ₅₀	95% Conf.	INTERVAL	95% Conf.

	(nM)	Int.	LO	Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	0,1551	da 0,08521 a 0,2824	12280	da 10802 a 13758
FS18-7- 62/84G09LALA	0,1424	da 0,08665 a 0,2340	12120	da 10897 a 13342
FS18-7- 78/84G09LALA	0,2774	da 0,1220 a 0,6310	14156	da 11970 a 16341
84G09 LALA	0,1884	da 0,08960 a 0,3962	10077	da 8612 a 11542
FS18-7- 09/4420LALA	-	-	1010	da 384,8 a 1635
FS18-7- 62/4420LALA	-	-	416,1	da -443,1 a 1275
FS18-7- 78/4420LALA	-	-	411	da -1103 a 1925
84G09 LALA + FS18-7- 09/4420LAL	0,2455	da 0,1030 a 0,5850	11836	da 9888 a 13785
84G09 LALA + FS18-7- 62/4420LAL	0,1601	da 0,05399 a 0,4750	11448	da 8958 a 13937
84G09 LALA + FS18-7-	0,1774	da 0,06863 a 0,4587	12250	da 9955 a 14544

OK

78/4420LAL				
4420 LALA	-	-	218,6	da -35,91 a 473,1
Saggio 1 Donatore B				
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	INTERVAL LO	95% Conf. Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	0,0731 6	da 0,02255 a 0,2374	11825	da 8919 a 14730
FS18-7- 62/84G09LALA	0,0323 6	da 0,007146 a 0,1465	12170	da 8419 a 15921
FS18-7- 78/84G09LALA	0,0971 8	da 0,03128 a 0,3019	15198	da 11594 a 18802
84G09 LALA	0,0856 2	da 0,03403 a 0,2154	12343	da 9957 a 14730
FS18-7- 09/4420LALA	-	-	1337	da -195,8 a 2870
FS18-7- 62/4420LALA	-	-	2508	da -2118 a 7133
FS18-7- 78/4420LALA	-	-	1425	da -58,52 a 2908
84G09 LALA + FS18-7- 09/4420LAL	0,2861	da 0,1005 a 0,8143	16037	da 12890 a 19184

84G09 LALA + FS18-7- 62/4420LAL	0,1431	da 0,02857 a 0,7172	13907	da 9358 a 18455
84G09 LALA + FS18-7- 78/4420LAL	0,3775	da 0,08929 a 1,596	14418	da 10502 a 18334
4420 LALA	-	-	2293	da 1028 a 3558
Saggio 2 Donatore A				
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	INTERVAL LO	95% Conf. Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	0,2761	da 0,1654 a 0,4611	20727	da 18729 a 22724
FS18-7- 33/84G09LALA	0,1934	da 0,07990 a 0,4681	171 03	da 14156 a 20049
FS18-7- 78/84G09LALA	0,2384	da 0,1596 a 0,3560	19822	da 18311 a 21333
84G09 LALA	0,3788	da 0,1166 a 1,230	11745	da 9138 a 14352
FS18-7- 09/4420LALA	-	-	1991	da -1927 a 5909
FS18-7- 33/4420LALA	-	-	~ 1.053e+0	(Molto ampio)

			06	
FS18-7- 78/4420LALA	-	-	~ 72657	(Molto ampio)
84G09 LALA + FS18-7- 09/4420LALA	0,5202	da 0,2624 a 1,031	23346	da 20230 a 26462
84G09 LALA + FS18-7- 33/4420LALA	0,2881	da 0,1529 a 0,5428	22529	da 19853 a 25205
84G09 LALA + FS18-7- 78/4420LALA	0,4335	da 0,2089 a 0,8996	20955	da 18038 a 23873
Saggio 2 Donatore B				
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	INTERVAL LO	95% Conf. Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	0,139	da 0,04157 a 0,4646	21572	da 16269 a 26874
FS18-7- 33/84G09LALA	0,0727 8	da 0,01615 a 0,3280	19554	da 13408 a 25699
FS18-7- 78/84G09LALA	0,1356	da 0,03552 a 0,5178	22319	da 16212 a 28426
84G09 LALA	0,1959	da 0,03365 a 1,140	12077	da 7938 a 16216

FS18-7- 09/4420LALA	-	-	1272	da -963,4 a 3507
FS18-7- 33/4420LALA	-	-	2272	da -190,8 a 4735
FS18-7- 78/4420LALA	-	-	1960	da -1287 a 5207
84G09 LALA + FS18-7- 09/4420LALA	0,2889	da 0,07772 a 1,074	23661	da 17835 a 29488
84G09 LALA + FS18-7- 33/4420LALA	0,3	da 0,06936 a 1,298	26145	da 18971 a 33320
84G09 LALA + FS18-7- 78/4420LALA	0,271	da 0,03980 a 1,845	25489	da 16292 a 34686
Saggio 1 Donatore C				
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	INTERVAL LO	95% Conf. Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	0,0673 9	da 0,01933 a 0,2349	2987	da 15107 a 27710
84G09 LALA	0,0834 7	da 0,0331 a 0,2105	1509	da 11046 a 17414
84G09 LALA +	0,1618	da 0,06635 a	1744	da 13346 a

FS18-7- 09/4420LALA		0,3944		20704
Saggio 1 Donatore D				
	EC ₅₀ (nM)	95% Conf. Int.	INTERVAL LO	95% Conf. Int.
FS18-7- 09/84G09LALA	0,0437 3	da 0,01797 a 0,1064	1850	da 15995 a 23799
84G09 LALA	0,0704 3	da 0,03483 a 0,1424	1045	da 10996 a 15405
84G09 LALA + FS18-7- 09/4420LALA	0,1351	da 0,08359 a 0,2182	968	da 15318 a 19403

Esempio 4: Attività in vivo di molecole di mAb² in modelli tumorali murini

4.1 Attività delle molecole di mAb² in un modello tumorale non insediato

5 MC38

Il modello di tumore singenico MC38 è stato usato in questo esperimento poiché i tumori MC38 sono noti esprimere PD-L1 sulla loro superficie cellulare e per essere altamente immunogenici avendo come risultato un'espressione di LAG-3 aumentata sulle cellule immunitarie nel tumore e nella periferia tumorale.

Il mAb² murino surrogato FS18-7-108-29/S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 117 e 119) denominato FS18-29/S1 è stato testato per l'attività *in vivo* usando un modello di crescita tumorale singenico

murino MC38. La capacità del mAb² di inibire la crescita del tumore è stata confrontata con quella del mAb² contro LAG-3/fittizio, FS18-7-108-29/4420 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 132 e 85) denominato FS18-29/4420, del mAb anti-LAG-3 di riferimento C9B7W (2B scientific; Numero di catalogo BE0174-50MG), del mAb anti-PD-L1 di riferimento S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 122 e 119) e con una combinazione di mAb C9B7W e S1.

I topi di sesso femminile C57BL/6 (Charles River) di 8-10 settimane di età e del peso di 20-25 g ciascuno sono stati fatti riposare per una settimana prima dell'inizio dello studio. Tutti gli animali sono stati forniti di microchip e dotati di un identificatore univoco. Ogni coorte aveva 10 topi. La linea di cellule di carcinoma del colon MC38 (S. Rosenberg, NIH) è stata inizialmente espansa, conservata e poi sottoposta a pre-screening da IDEXX BioResearch per gli agenti patogeni usando il protocollo IMPACT I e si è dimostrata priva di agenti patogeni. Cellule MC38 sono state scongelate da -150 °C di conservazione e aggiunte a 20 ml di DMEM (Gibco, 61965-026) con il 10% di FCS (Gibco, 10270-106) in un pallone per coltura tissutale T175. I topi sono stati anestetizzati usando isoflurano (Abbott Laboratories) e ogni animale ha ricevuto 2×10^6 cellule iniettate per via sottocutanea nel fianco sinistro. 7-8 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, i topi che a questo punto non avevano tumori sono stati rimossi dallo studio.

Tutte le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati analizzati entro 24 ore prima dell'iniezione mediante profilo SEC-HPLC e controllati per la presenza di impurità. Gli anticorpi sono stati preparati ad una concentrazione finale di 10 mg/kg in PBS e combinati

con un secondo anticorpo negli studi di combinazione. Le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati somministrati ai topi mediante iniezione intraperitoneale (IP) nei giorni 8, 11 e 14 successivi all'inoculazione del tumore. Sono state prese misurazioni accurate dei tumori, è stato eseguito qualsiasi dosaggio di farmaco dovuto il giorno in questione e i topi sono stati sottoposti a stretta osservazione per il resto della sperimentazione. Le misurazioni del volume del tumore sono state prese con calibri per determinare l'asse più lungo e l'asse più corto del tumore. La seguente formula è stata usata per calcolare il volume del tumore:

$$L \times (S^2) / 2$$

Dove L = asse più lungo; S = asse più corto

La sperimentazione è stata interrotta al giorno 20 quando il carico tumorale è stato considerato vicino ai limiti. Tutti i topi sono stati sacrificati umanamente e i tumori sono stati asportati e pesati.

I risultati sono mostrati nelle **Figure 5 e 6**. I topi trattati con mAb² contro LAG-3/PD-L1 (FS18-29/S1) avevano tumori terminali con pesi significativamente inferiori rispetto a quelli trattati con una combinazione di mAb di riferimento, C9B7W e S1. Nello specifico, l'analisi statistica dei pesi dei tumori terminali è stata eseguita usando un test t di Student a due code all'interno del pacchetto di software GraphPad Prism che dimostra una differenza statistica significativa tra la somministrazione di FS18-29/S1 e la somministrazione della combinazione di anticorpi di riferimento C9B7W e S1 (p = 0,0125), indicando che l'inibizione di LAG-3 e PD-L1 fornita dalla stessa molecola ha avuto come risultato un effetto sinergico sui

pesi dei tumori terminali rispetto all'inibizione di LAG-3 e PD-L1 fornita da molecole separate.

Anche il mAb² surrogato FS18-29/S1 ha avuto un effetto marcato sulla crescita tumorale impedendo l'insediamento in 6 degli 8 tumori MC38 in crescita e rallentando la crescita dei restanti 2. La somministrazione degli anticorpi anti-LAG-3 e PD-L1 di riferimento in combinazione ha rallentato la crescita tumorale in 7 animali senza che nessun animale fosse privo di tumore.

FS18-29/4420 da solo non ha avuto un effetto marcato sulla crescita tumorale, indicando che per la massima efficacia, il mAb² richiede il Fab anti-PD-L1. Il solo anticorpo anti-LAG-3 murino di riferimento ha avuto poco effetto o nullo sulla crescita tumorale risultante, mentre l'anti-PD-L1 murino di riferimento ha impedito l'insediamento di 1 dei 7 tumori in questa coorte e ha avuto un effetto complessivo di rallentamento della crescita tumorale.

I modelli murini singenici sono accettati come sistemi murini appropriati per testare l'effetto antitumorale dell'inibizione di bersagli terapeutici e sono stati ampiamente usati per convalidare lo sviluppo di agenti terapeutici per l'uomo.

4.2 Attività delle molecole di mAb² in un modello di tumore MC38 insediato

Il mAb² murino surrogato FS18-7-108-29/S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 117 e 119) denominato FS18-29/S1, è stato testato per l'attività *in vivo* in un modello di crescita tumorale singenico murino MC38. La capacità del mAb² di inibire la crescita del tumore è stata confrontata con quella del mAb² contro LAG-3/fittizio, FS18-7-108-29/4420 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 132 e 85), denominato

FS18-29/4420, del mAb contro LAG-3 di riferimento C9B7W, del mAb contro PD-L1 di riferimento S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 122 e 119) e con una combinazione di C9B7W e S1.

I topi di sesso femminile C57BL/6 (Charles River) di 8-10 settimane di età e del peso di 20-25 g ciascuno sono stati fatti riposare per una settimana prima dell'inizio dello studio. Tutti gli animali sono stati forniti di microchip e dotati di un identificatore univoco. Ogni coorte aveva 10 topi. La linea di cellule di carcinoma del colon MC38 (S. Rosenberg, NIH) è stata inizialmente espansa, conservata e poi sottoposta a pre-screening da IDEXX BioResearch per gli agenti patogeni usando il protocollo IMPACT I e si è dimostrata priva di agenti patogeni. Cellule MC38 (approssimativamente $3-5 \times 10^6$) sono state scongelate da -150°C di conservazione e aggiunte a 20 ml di DMEM (Gibco, 61965-026) con il 10% di FCS (Gibco, 10270-106) in un pallone per coltura tissutale T175. I topi sono stati anestetizzati usando isofluorano (Abbot Laboratories) e 2×10^6 cellule in 100 μl sono state iniettate per via sottocutanea nel fianco sinistro di ciascun topo. 7-8 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, i topi sono stati monitorati come di routine sullo stato di salute e la crescita del tumore appropriata per l'inizio dello studio. Quando la maggior parte dei topi presentava tumori di 5-10 mm di diametro, sono stati separati e randomizzati nuovamente in coorti di studio. Qualsiasi topo che a questo punto non aveva tumori di dimensioni appropriate è stato rimosso dallo studio.

Tutte le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati analizzati entro 24 ore prima dell'iniezione mediante profilo SEC-HPLC e controllati per la presenza di impurità. Gli anticorpi sono stati

preparati ad una concentrazione finale di 10 mg/kg in PBS e combinati con il secondo anticorpo per gli studi di combinazione. Le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati somministrati ai topi nei giorni 15, 18 e 21 dopo l'inoculazione del tumore mediante iniezione IP.

5 Gli animali sono stati sottoposti a screening per lo stato di salute in anestesia tre volte alla settimana in cieco, durante le quali sono state prese misurazioni accurate dei tumori. Le misurazioni del volume del tumore sono state prese con calibri per determinare l'asse più lungo e l'asse più corto del tumore. La formula usata per calcolare il volume

0 del tumore era come esposto nella sezione 4.1 di cui sopra.

La sperimentazione è stata interrotta al giorno 24 quando il carico tumorale è stato considerato vicino ai limiti. Tutti i topi sono stati sacrificati umanamente e i tumori sono stati asportati e pesati. I risultati sono mostrati nelle **Figure 7 e 8**.

5 Il controllo o la soppressione efficaci della crescita tumorale nei modelli tumorali singenici nei topi si ottiene al meglio attraverso l'intervento terapeutico nei punti temporali precoci (volumi tumorali iniziali inferiori a 40 mm³). Più tardi viene somministrato l'intervento, più è difficile osservare effetti positivi rispetto alla crescita

0 tumorale, sebbene forse questo sia più analogo alla situazione nel contesto clinico umano.

FS18-29/S1 ha avuto un effetto positivo sia nel sopprimere la crescita tumorale sia nel prevenire l'insediamento del carcinoma del colon MC38 in topi immunocompetenti quando somministrato in punti

5 temporali precoci in topi C57BL/6. Quando somministrato in punti temporali successivi (volumi tumorali iniziali di 50-125 mm³), FS18-

29/S1 è stato altrettanto efficace nel sopprimere la crescita tumorale quanto la combinazione di anticorpi di riferimento. FS18-29/4420 da solo non ha avuto alcun impatto evidente sulla crescita tumorale e S1 e C9B7W hanno entrambi avuto un effetto lieve sulla crescita tumorale risultante.

5 4.3 Attività delle molecole di mAb² in un modello di tumore CT26 non insediato

Il modello di tumore singenico CT26 è stato usato in questo esperimento poiché i tumori CT26 sono noti esprimere PD-L1 sulla loro superficie cellulare ed essere altamente immunogenici avendo come risultato un'espressione di LAG-3 aumentata sulle cellule immunitarie nel tumore e nella periferia.

Il mAb² murino surrogato FS18-7-108-29/S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 117 e 119), denominato FS18-29/S1, e FS18-7-108-35/S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 120 e 119), denominato FS18-5 35/S1, sono stati testati per l'attività *in vivo* in un modello di crescita singenico di tumore murino CT26. La capacità del mAb² di inibire la crescita del tumore è stata confrontata con quella del mAb² contro LAG-3/fittizio, FS18-7-108-29/4420 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 132 e 85), denominato FS18-29/4420, e FS18-7-108-35/4420 contenente 0 la mutazione LALA (SEQ ID NO: 133 e 85), denominato FS18-35/4420, del mAb contro LAG-3 di riferimento C9B7W, del mAb contro PD-L1 di riferimento S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 122 e 119) e con una combinazione di C9B7W e S1.

I topi di sesso femminile BALB/c (Charles River) di 8-10 settimane 5 di età e del peso di 20-25 g ciascuno sono stati fatti riposare per una settimana prima dell'inizio dello studio. Tutti gli animali sono stati

forniti di microchip e dotati di un identificatore univoco. Ogni coorte aveva 10 topi. La linea di cellule di carcinoma del colon CT26 (ATCC, CRL-2638) è stata inizialmente espansa, conservata e poi sottoposta a pre-screening da IDEXX BioResearch per gli agenti patogeni usando il protocollo IMPACT I e si è dimostrata priva di agenti patogeni. Le 5 cellule CT26 (approssimativamente $3-5 \times 10^6$) sono state scongelate da -150 °C di conservazione e aggiunte a 20 ml di DMEM (Gibco, 61965-026) con il 10% di FCS (Gibco, 10270-106) in un pallone per coltura tissutale T175. 7-8 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, i topi sono 0 stati monitorati come di routine sullo stato di salute e la crescita del tumore appropriata per l'inizio dello studio. Quando la maggior parte dei topi presentava tumori con un diametro di $3-5 \text{ mm}^3$, essi sono stati separati e randomizzati nuovamente in coorti di studio. Qualsiasi topo che non aveva tumori a questo punto è stato rimosso dallo studio.

5 Tutte le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati analizzati entro 24 ore dall'iniezione mediante profilo di SEC-HPLC e controllati per le impurità. Gli anticorpi sono stati preparati ad una concentrazione finale di 10 mg/kg in PBS e combinati con un secondo anticorpo negli studi di combinazione. Le molecole di mAb² e gli 0 anticorpi di controllo sono stati somministrati ai topi nei giorni 8, 11 e 14 dopo l'inoculazione del tumore. Gli animali sono stati sottoposti a screening per lo stato di salute durante il quale sono state prese misurazioni accurate dei tumori. Le misurazioni del volume del tumore sono state prese con calibri per determinare l'asse più lungo e l'asse 5 più corto del tumore. La formula usata per calcolare il volume del tumore era come esposto nella sezione 4.1 di cui sopra:

La sperimentazione è stata interrotta al giorno 20 quando il carico tumorale è stato considerato vicino ai limiti. Tutti i topi sono stati sacrificati umanamente e i tumori sono stati asportati e pesati. I risultati sono mostrati nelle **Figure 9 e 10**.

5 L'analisi statistica dei pesi del tumore terminale è stata eseguita usando un test t di Student a due code all'interno del pacchetto del software GraphPad Prism. L'analisi statistica delle curve di crescita tumorale è stata determinata usando la funzione di confronto delle curve di crescita dal pacchetto **statmod** Statistical Modeling (Elso et al., 0 2004 e Baldwin et al., 2007), disponibile da R Project per Statistical Computing.

Vi era una differenza statistica significativa dimostrata tra il mAb² FS18-35/S1 e il controllo con IgG (crescita normale) nella soppressione della crescita tumorale. Tale differenza statisticamente 5 significativa non è stata osservata né con la combinazione di anticorpi di riferimento, né con il mAb² FS18-29/S1 rispetto al gruppo di controllo con IgG, o rispetto a qualsiasi altra coorte in questa sperimentazione.

Il modello di tumore CT26 è un modello di tumore aggressivo a crescita rapida, che è intrinsecamente incline allo sviluppo di metastasi 0 intestinali da parte dei topi, e di conseguenza ha una finestra terapeutica molto limitata.

Sorprendentemente la combinazione di anticorpi di riferimento contro LAG-3 e PD-L1 non ha soppresso significativamente la crescita tumorale rispetto alla coorte di controllo con IgG. Tuttavia, la coorte 5 trattata con FS18-35/S1 ha rivelato una significativa soppressione della crescita rispetto al controllo con IgG. FS18-29/S1, sebbene abbia

soppresso anche la crescita tumorale rispetto al controllo con IgG, non era statisticamente significativo. Questa sperimentazione mostra un secondo modello di tumore in cui il mAb² contro LAG-3/PD-L1 murino reattivo ha dimostrato un effetto positivo nel rallentare la crescita del tumore almeno nella stessa misura della somministrazione di una
5 combinazione di anticorpi monoclonali di riferimento.

4.4 Effetto della mutazione LALA sull'inibizione della crescita tumorale nel modello di tumore non insediato MC38

Due mAb² (FS18-7-108-29/S1 LALA e FS18-7-108-29/S1) sono stati
0 testati per esaminare le differenze potenziali nell'attività antitumorale di questi mAb² con e senza la mutazione LALA nella regione Fc. Il mAb² murino surrogato FS18-7-108-29/S1 denominato FS18-29/S1 con (SEQ ID NO: 117 e 119) e senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 118 e 119) sono stati testati per l'attività *in vivo* usando un modello di crescita
5 tumorale singenico murino MC38. La capacità del mAb² di inibire la crescita del tumore è stata confrontata con quella del mAb² contro LAG-3/fittizio, FS18-7-108-29/4420 con (SEQ ID NO: 132 e 85) e senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 134 e 85) denominati FS18-29/4420LALA e FS18-29/4420 e una combinazione del mAb² contro LAG-3/fittizio con e senza
0 mutazione LALA con il mAb di riferimento contro PD-L1 S1 con (SEQ ID NO: 122 e 119) e senza la mutazione LALA (SEQ ID NO: 123 e 119).

I topi di sesso femminile C57BL/6 (Charles River) di 8-10 settimane di età e del peso di 20-25 g ciascuno sono stati fatti riposare per una settimana prima dell'inizio dello studio. Tutti gli animali sono stati
5 forniti di microchip e dotati di un identificatore univoco. Ogni coorte aveva 10 topi. La linea di cellule di carcinoma del colon MC38 (S.

Rosenberg, NIH) è stata inizialmente espansa, conservata e poi sottoposta a pre-screening da IDEXX BioResearch per gli agenti patogeni usando il protocollo IMPACT I e si è dimostrata priva di agenti patogeni. Le cellule MC38 (approssimativamente $3-5 \times 10^6$) sono state scongelate da -150 °C di conservazione e aggiunte a 20 ml di DMEM (Gibco, 61965-026) con il 10% di FCS (Gibco, 10270-106) in un pallone per coltura tissutale T175. I topi sono stati anestetizzati usando isofluorano (Abbot Laboratories) e 2×10^6 cellule in 100 μ l sono state iniettate per via sottocutanea nel fianco sinistro di ciascun topo. I topi sono stati lasciati recuperare sotto osservazione e la data di inoculazione è stata indicata come Giorno 0. 7-8 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, i topi sono stati monitorati come di routine sullo stato di salute e la crescita del tumore appropriata per l'inizio dello studio. Qualsiasi topo che non aveva tumori a questo punto è stato rimosso dallo studio.

Tutte le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati analizzati entro 24 ore prima dell'iniezione mediante profilo SEC-HPLC e controllati per la presenza di impurità. Gli anticorpi sono stati preparati ad una concentrazione finale di 10 mg/kg in PBS e combinati con un secondo anticorpo negli studi di combinazione. Le molecole di mAb² e gli anticorpi di controllo sono stati somministrati ai topi nei giorni 8, 11 e 14 dopo inoculazione del tumore mediante iniezione IP. Gli animali sono stati sottoposti a screening per lo stato di salute in anestesia tre volte alla settimana in cieco, durante le quali sono state prese misurazioni accurate dei tumori. Le misurazioni del volume del tumore sono state prese con calibri per determinare l'asse più lungo e

l'asse più corto del tumore. La formula usata per calcolare il volume del tumore era come esposto nella sezione 4.1.

Tutti i topi sono stati sacrificati umanamente e i tumori sono stati asportati e pesati. I risultati sono mostrati nelle **Figure 11 e 12**.

Questa sperimentazione conferma che la presenza o l'assenza della mutazione LALA, che abroga l'attività di ADCC, non ha alcun effetto statisticamente significativo sulla crescita tumorale nel modello di carcinoma del colon MC38, tuttavia quei mAb² che includevano la mutazione LALA tendevano ad avere come risultato una soppressione della crescita tumorale aumentata. Tuttavia, la base logica per includere la mutazione per inibire potenzialmente l'attività di ADCC contro le cellule T che esprimono LAG-3 o PD-L1 è giustificata poiché la mutazione LALA non ha alcun effetto dannoso sull'attività antitumorale del mAb² contro LAG-3/PD-L1. Vi era una certa evidenza che suggeriva che l'inclusione della mutazione LALA fosse critica solo per l'anticorpo contro PD-L1.

Questa sperimentazione ha anche esaminato se il mAb² contro LAG-3/PD-L1 può avere un'efficacia aumentata rispetto alla somministrazione dei singoli anticorpi (LAG-3 LALA + PD-L1 LALA). In questo caso non vi era alcuna differenza significativa tra queste due coorti. Entrambi i gruppi hanno soppresso la crescita nel modello di carcinoma del colon MC38.

4.5 Conclusione

Nel complesso, è chiaro dai risultati di cui sopra che vi è un effetto sinergico sulla soppressione della crescita tumorale quando una molecola di mAb² comprendente siti di legame sia per LAG-3 sia per PD-

L1 viene somministrata ai topi nei modelli murini testati. Sulla base di questi risultati, si prevede che le molecole anticorpali dell'invenzione mostreranno un effetto superiore nel trattamento del cancro in pazienti umani, in particolare nella soppressione della crescita tumorale, rispetto alla somministrazione di due molecole separate che legano rispettivamente LAG-3 e PD-L1.

Esempio 5: Effetto del trattamento con mAb² sull'espressione di LAG-3 delle cellule T

Il meccanismo mediante il quale il mAb² murino surrogato FS18-7-108-29/S1 contenente la mutazione LALA, (SEQ ID NO: 117 e 119) denominato FS18-29/S1 ha portato a un carico tumorale diminuito è stato testato in un modello di crescita tumorale singenico murino MC38 che esprime ovalbumina (MC38.OVA). L'effetto di FS18-29/S1 è stato confrontato con quello del mAb² contro LAG-3/fittizio, FS18-7-108-29/4420 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 132 e 85), denominato FS18-29/4420, del mAb di riferimento contro PD-L1 S1 contenente la mutazione LALA (SEQ ID NO: 122 e 119) e con una combinazione di FS18-29/4420 e S1.

Il giorno dell'impianto, le cellule MC38.OVA coltivate sono state raccolte durante la crescita in fase logaritmica (Confluenza ~75%) e risospese in PBS ad una concentrazione di 1×10^7 cellule/mL. I tumori sono stati iniziati in primo luogo anestetizzando ciascun animale con isoflurano, poi impiantando per via sottocutanea 1×10^6 cellule MC38.OVA (0,1 mL di sospensione) nel fianco sinistro di ciascun animale di test. Undici giorni dopo l'impianto di cellule tumorali gli animali sono stati randomizzati, usando un metodo di randomizzazione deterministico, in cinque gruppi con volumi di tumore individuali da 32 a 62,5 mm³. Agli

animali è stata fornita una dose di 10 mg/kg di anticorpo o mAb² il giorno 12, 14 e 16 dopo l'inoculazione del tumore, e i tumori sono stati raccolti da tre animali/gruppo ai giorni 19 e 23 dopo l'inoculazione del tumore. Il dissociatore GentleMACS™ è stato usato per dissociare il tumore con cellule successivamente setacciate attraverso un setaccio per cellule da 70 µm per ottenere una sospensione di singole cellule. 1x10⁶ cellule/pozzetto su una piastra a 96 pozzetti sono state risospese in tampone FACS con colorazione per vitalità 1:3000 e Fc block (anticorpo anti-CD16/32). Le cellule per l'analisi FACS sono state colorate usando una Master Mix che includeva anticorpi marcati contro CD43, CD8a, CD4, FoxP3 e LAG-3. Per la colorazione intracellulare di FoxP3, le cellule sono state fissate e permeabilizzate prima della colorazione con l'anticorpo FoxP3. I campioni sono stati fatti correre sul citometro a flusso Canto II con una matrice di compensazione e un minimo di 500.000 eventi contati.

In questo esperimento, i TIL sono stati esaminati per l'espressione di LAG-3 dopo la somministrazione della terza dose di anticorpo/mAb², quando si è osservata una separazione nella crescita del tumore tra i trattamenti di controllo e con mAb², ma prima che vi fosse una grande differenza tra le dimensioni del tumore che potesse alterare i risultati. A questo punto, l'espressione di LAG-3 sui TIL è risultata notevolmente diminuita in animali trattati con il mAb² FS18-29/S1 o con la combinazione di FS18-29/4420 e S1. Nello specifico, come mostrato nella **Figura 13**, l'espressione di LAG-3 sui linfociti infiltranti il tumore (TIL) CD8, CD4 e FoxP3 è diminuita dopo il trattamento con FS18-29/S1 al giorno 19 e 23 dopo l'inoculazione del tumore, che corrisponde

rispettivamente a 3 e 7 giorni dopo l'ultimo dosaggio di anticorpo/mAb².
La diminuzione dell'espressione di LAG-3 era più pronunciata al giorno
23, ma era ancora evidente al giorno 19. Gli animali a cui è stata
somministrata una combinazione di FS18-29/4420 e S1 mostrano anche una
5 diminuzione dell'espressione di LAG-3 sui TIL, ma l'effetto è stato
ritardato fino al giorno 23, mentre il trattamento con FS18-29/4420 o
S1 somministrato singolarmente ha avuto un effetto minimo o nullo
sull'espressione di LAG-3 sui TIL.

Questi risultati mostrano che la doppia inibizione di LAG-3 e PD-
0 L1 è necessaria per una diminuzione dell'espressione di LAG-3 da parte
di TIL, poiché questo fenomeno non è stato osservato in animali trattati
con singoli agenti contro LAG-3 o PD-L1. Senza voler essere legati alla
teoria, si ritiene che il doppio trattamento con anti-LAG-3 e anti-PD-
L1 porti a una diminuzione dell'espressione di LAG-3 su TIL, riducendo
5 così l'effetto inibitorio di LAG-3 e consentendo ai TIL di superare
l'esaurimento. Una volta attivati i TIL, essi sono in grado di
riconoscere i neo-antigeni espressi dal tumore e di montare una risposta
contro di esso. Si ritiene pertanto che questo sia il meccanismo mediante
il quale il trattamento con mAb² anti-LAG3/PD-L1 ha come risultato una
0 riduzione del carico tumorale.

Esempio 6: Citotossicità cellulare anticorpo-dipendente e attività
citotossica dipendente dal complemento di mAb²

Gli anticorpi IgG1 presentano solitamente funzioni effettrici
attraverso siti di interazione conservati all'interno della regione
5 costante della molecola. Questi includono la citotossicità cellulare
anticorpo-dipendente (ADCC), mediata dal legame a FcγR espresso su

monociti/macrofagi, cellule dendritiche, cellule NK, neutrofili e altri granulociti, e la citotossicità dipendente dal complemento (CDC), mediata dall'induzione della cascata di complementi iniziata dal legame al componente del complemento C1q. Poiché LAG-3 è espresso prevalentemente sulle cellule T attivate e PD-L1 è espresso su queste ma anche sulle cellule tumorali a livelli elevati, è stata studiata la capacità del mAb² FS18-7-9/84G09 (SEQ ID NO 94 e 116) di indurre ADCC e CDC.

Nello specifico, è stato testato se il trattamento con FS18-7-9/84G09 di cellule esprimenti LAG-3 o PD-L1, seguito dall'incubazione con cellule NK o complemento, induce la lisi delle rispettive cellule bersaglio. Inoltre, poiché FS18-7-9/84G09 è un anticorpo bispecifico, è stato anche testato se l'impegno del bersaglio su una delle specificità influenzi la funzione effettrice verso le cellule che esprimono il bersaglio per l'altra specificità.

Comprendere le funzioni effettrici del mAb² FS18-7-9/84G09 è utile per una serie di ragioni, incluse determinare se una mutazione che riduce le funzioni effettrici, come la mutazione LALA, deve essere inclusa nella molecola per proteggere le cellule T effettrici che esprimono LAG-3 impegnate nell'uccisione del tumore da ADCC e/o CDC mediate da FS18-7-9/84G09.

6.1 Disegno dello studio

Cellule Raji che esprimono in modo ricombinante LAG-3 o PD-L1 sono state usate per tutti i saggi, usando la loro espressione endogena di CD20 come controllo per il bersagliamento con una versione generica di Rituximab per dimostrare l'attività funzionale del complemento aggiunto

e delle preparazioni di cellule NK indipendenti dall'espressione ricombinante delle proteine bersaglio. L'espressione bersaglio è stata confermata prima di questi esperimenti.

5 Per determinare l'attività di CDC di base verso le cellule esprimenti LAG-3 o PD-L1, questa attività è stata misurata usando il rilascio di LDH, misurato mediante conversione di un substrato in un colorante fluorescente (CytoTox-ONE™ di Promega). Per misurare quali cellule bersaglio in una miscela cellulare comprendente sia le cellule esprimenti LAG-3 sia le cellule esprimenti PD-L1 sono state sottoposte a lisi, la CDC differenziale è stata misurata mediante citometria a flusso di cellule bersaglio marcate con fluorescenza in modo differenziale dopo incubazione con il mAb²/anticorpo, rilevando le cellule morte usando un colorante fluorescente escluso dalle cellule vive.

5 Per determinare l'attività di ADCC verso le cellule esprimenti LAG-3 o PD-L1, questa attività è stata misurata usando cellule NK isolate da PBMC congelate e rilascio di LDH misurato colorimetricamente (CytoTox 96 da Promega). Per tutti questi studi, è stato usato come controllo Rituximab in varie configurazioni di isotipi e Fc. Non è noto alcun metodo affidabile per misurare l'ADCC in modo differenziale, pertanto l'attività differenziale di ADCC non è stata misurata.

In tutti gli esperimenti, come controlli, sono stati usati il mAb specifico per PD-L1 (84G09) e il mAb specifico per LAG-3 (25F7). È stato anche usato un controllo con isotipo IgG (4420) che è stato usato come controllo negativo o per generare l'attività di sfondo di CDC. Le versioni di LALA dei rispettivi anticorpi e mAb² (escluso 25F7) sono

state anche confrontate con le versioni wild-type di IgG1 nei saggi di CDC e ADCC per determinare l'effetto di questa mutazione su queste funzioni effettrici.

6.2 Materiali e metodi

5 6.2.1 Saggi di CDC

Tutti gli anticorpi/mAb², incluso Rituximab, sono stati diluiti in diluizioni in serie di 10 punti 1 su 2. Sono stati anche preparati pozzetti di controllo contenenti l'IgG (4420 LALA) alla massima concentrazione usata. Sospensioni cellulari di cellule Raji che
0 esprimono in modo ricombinante rispettivamente LAG-3 o PD-L1, sono state preparate in terreno privo di siero per il saggio di rilascio di LDH e aggiunte a un volume uguale di anticorpi/mAb² preparati.

Per il saggio di CDC basato sulla citometria a flusso, sospensioni cellulari di 5×10^7 cellule sono state preparate e risospese in 0,5 μ M
5 di rosso scuro CellTracker (CellTracker™ Deep Red, Thermo Fisher, n. C34565) o 5 μ M di verde CellTracker (CellTracker™ Green CMFDA (5-clorometilfluoresceina diacetato, Thermo Fisher, n. C7025) in terreno privo di siero. Dopo 30 minuti di incubazione a 37 °C, le cellule sono state lavate in terreno privo di siero e aggiunte direttamente ai
0 pozzetti contenenti anticorpi/mAb² preparati, o combinate con l'altra linea cellulare colorata in modo differenziale a volumi uguali e poi aggiunte ai pozzetti contenenti anticorpi/mAb² come descritto sopra. Per entrambi i saggi, dopo un'incubazione di 30 minuti in condizioni di
5 coltura cellulare, i pozzetti sono stati riempiti con un volume uguale di complemento di coniglio neonato, 10% in terreno privo di siero (complemento di coniglio giovane, TEBU-bio, n. CL3441). Le piastre sono

state incubate per 4 ore in condizioni di coltura cellulare. Per il saggio di CDC di rilascio di LDH, sono stati generati controlli di lisi al 100% aggiungendo Triton X 100 alla metà dei pozzetti trattati con 4420 LALA e il saggio Cytotox è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore (CytotoxOne, Promega, G7891). Dopo aver ottenuto le letture, il segnale dai controlli di lisi al 100% è stato impostato al 100% e i segnali dai pozzetti per campioni sono stati calcolati come percentuale di quel livello.

Per il saggio di CDC basato sulla citometria a flusso, al termine del periodo di incubazione, il colorante per cellule morte (colorante blu per cellule morte SYTOX®, Thermo Fisher, n. S34857) è stato diluito 1 in 500 in PBS e i pozzetti sono stati riempiti con un volume uguale. La citometria a flusso è stata eseguita su un citometro a flusso Cytotoflex sottoponendo a gating le popolazioni cellulari intatte in base a FSC e SSC e rilevando la percentuale di cellule positive per Sytox (canale PB450) delle popolazioni cellulari positive sia per CellTracker™ Deep Red sia per CellTracker™ Green CMFDA.

6.3.2 Saggio di ADCC

ADCC è stato misurato come descritto in precedenza (Broussas, Matthieu; Broyer, Lucile; e Goetsch, Liliane. (2013) Evaluation of Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity Using Lactate Deidrogenase (LDH) Measurement in Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. New York: Springer Science + Business Media. Volume 988, pagine 305-317). In breve, le cellule bersaglio sono state pre-incubate con gli anticorpi prima di aggiungere le cellule NK primarie isolate dalle PBMC umane (kit di isolamento delle

cellule NK, Miltenyi Biotec, 130-092-657) in un rapporto di 20 a 1 per 4 ore. Il saggio di citotossicità è stato eseguito seguendo le istruzioni del produttore (Saggio di citotossicità non radioattivo CytoTox 96, Promega, G1780). La % di lisi è stata calcolata sulla base della lisi delle cellule bersaglio al 100%, tenendo conto della lisi spontanea delle cellule effettrici e bersaglio.

6.3 Risultati e conclusioni

6.3.1 Saggio di CDC

Le cellule Raji esprimenti PD-L1 sono state bersagliate dall'anticorpo anti-CD20 Rituximab, il che ha avuto come risultato una lisi massima <60% quando la CDC veniva misurata mediante rilascio di LDH generico. L'anticorpo anti-PD-L1 84G09 (che comprende la porzione F(ab)₂ di mAb² FS18-7-9/84G09) e FS18-7-9/84G09 in formato di IgG1, hanno mostrato una lisi massima più elevata e anche una potenza di lisi più elevata, con mezze dosi massime stimate di circa la metà di quelle richieste da Rituximab in formato di IgG1. Ciò mostra che l'introduzione del sito di legame di LAG-3 nell'anticorpo 84G09 non ha modificato la sua attività di bersagliamento di PD-L1 rispetto alla potenza o alla risposta massima, poiché entrambi erano molto simili quando sono stati confrontati 84G09 e FS18-7-9/84G09. L'introduzione della mutazione LALA ha avuto come risultato una risposta massima ridotta per Rituximab, 84G09 e FS18-7-9/84G09, tuttavia, la potenza è stata ridotta solo per 84G09 e FS18-7-9/84G09. Come previsto, l'anticorpo anti-LAG-3 25F7 non aveva effetti sulla vitalità cellulare delle cellule Raji esprimenti PD-L1, poiché queste cellule non esprimevano LAG-3 umano. Questi risultati sono mostrati nella **Figura 14A**.

Le cellule Raji esprimenti LAG-3 sono state bersagliate per CDC dall'anticorpo anti-CD20 Rituximab, tuttavia, l'anticorpo contro LAG-3 25F7 ha mostrato una potenza persino migliore con una mezza dose massima stimata di circa la metà di quella richiesta per Rituximab. Nessuno degli altri anticorpi mostrava alcuna attività di CDC contro cellule Raji esprimenti LAG-3, incluso FS18-7-9/84G09. L'introduzione della mutazione LALA ha avuto un effetto molto limitato sull'attività di CDC di Rituximab (**Figura 14B**).

6.3.2 Saggio di CDC differenziale

Gli inventori hanno sviluppato un saggio di CDC differenziale, che impiega citometria a flusso, per distinguere quali cellule esprimenti il bersaglio sono state sottoposte a lisi quando trattate con FS18-7-9/84G09 o anticorpi di controllo. Questo saggio è stato usato per confermare i risultati dal saggio di CDC di rilascio di LDH di base descritto sopra. Rispetto all'anticorpo di controllo con isotipo IgG (4420), che non ha avuto alcun effetto sulla percentuale di cellule vive, Rituximab ha mediato una riduzione delle cellule vive e un aumento delle cellule morte, sia delle cellule che esprimono PD-L1 sia LAG-3. Tuttavia, FS18-7-9/84G09 non ha avuto alcun effetto sulle cellule esprimenti LAG-3, ma ha sottoposto a lisi in modo molto efficiente le cellule esprimenti PD-L1. Analogamente, la miscela dell'anticorpo specifico per LAG-3 25F7 e dell'anticorpo contro PD-L1 84G09 ha anche mostrato una diminuzione dose-dipendente delle cellule vive e un aumento reciproco delle cellule morte, tuttavia, la lisi massima delle cellule esprimenti LAG-3 era solo poco più del 50% delle cellule, ma è stata raggiunta già a una concentrazione intorno a 1 nM, la dose più bassa per

ottenere la lisi massima di tutti gli anticorpi testati. Ciò conferma il precedente risultato che il sito legante LAG-3 nel dominio CH3 di FS18-7-9/84G09 non induce la lisi mediata da CDC delle cellule bersaglio che esprimono LAG-3. Inoltre, questo esperimento mostra che la presenza di cellule che esprimono LAG-3 non ha effetti sull'attività di CDC di FS18-7-9/84G09 verso cellule che esprimono PD-L1. I risultati sono mostrati nella **Figura 15**.

6.3.3 Saggio di ADCC

Cellule Raji esprimenti PD-L1 sono state bersagliate per ADCC dall'anticorpo anti-CD20 Rituximab, FS18-7-9/84G09 e 84G09 con efficacia e potenza molto simili, avendo come risultato una lisi massima di circa il 40% delle cellule. Rituximab e 84G09 contenenti la mutazione LALA non hanno mostrato alcuna lisi mediata da ADCC e FS18-7-9/84G09 contenente la mutazione LALA non ha mostrato lisi mediata da ADCC o molto bassa di cellule bersaglio esprimenti PD-L1. L'anticorpo 25F7 specifico per LAG-3 e il controllo con isotipo 4420 con e senza la mutazione LALA non hanno mostrato alcuna attività in questo saggio.

Questi risultati mostrano che l'introduzione del sito legante LAG-3 nell'anticorpo 84G09 non ha cambiato la sua attività di ADCC mirata per PD-L1 in termini di potenza o risposta massima, poiché entrambi erano molto simili all'anticorpo specifico per PD-L1 84G09. L'introduzione della mutazione LALA ha avuto come risultato l'abrogazione dell'attività di ADCC (**Figura 16A**).

Cellule Raji esprimenti LAG-3 sono state bersagliate da Rituximab e 25F7 per la lisi mediata da ADCC, avendo come risultato una lisi massima di circa il 40%. FS18-7-9/84G09 ha anche mediato la lisi delle

cellule esprimenti LAG-3 mediante ADCC, sia con una potenza e un'efficacia molto inferiori, raggiungendo solo poco meno del 20% di lisi a una concentrazione di 2,5 nM. L'introduzione della mutazione LALA ha abrogato tutta l'attività di ADCC di Rituximab e FS18-7-9/84G09. 84G09 e il controllo con isotipo 4420 con e senza la mutazione LALA non hanno mostrato alcuna attività di ADCC in questo saggio come previsto, poiché questi anticorpi non legano LAG-3 (**Figura 16B**).

Elenco di sequenze

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-9

- 0 FS18-7-9 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)
FS18-7-9 ansa CD - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 2)
FS18-7-9 ansa EF - PYDRVWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-9 (SEQ ID NO: 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

- 5 Sequenza nucleotidica ottimizzata per codone CHO del dominio CH3 di Fcab FS18-7-9 (SEQ ID NO: 142)

GGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCTGGGATGAGCCCTGGGGCGA
GGATGTGTCTCTGACCTGTCTCGTAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG
AGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGCCCTACGACAGATGGGTGTGGCCCCGACGAGTTCTCCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCG
GC

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-9 (SEQ ID NO: 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG

- 0 Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-9 comprendente lisina C-terminale (SEQ ID NO: 135)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-9,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 6)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

- 5 Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-9 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-32

FS18-7-32 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

- 0 FS18-7-32 ansa CD - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 8)

FS18-7-32 ansa EF - PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-32 (SEQ ID NO: 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAAATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-32 (SEQ ID NO:
5 10)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-32
comprendente la mutazione LALA
(sottolineata) (SEQ ID NO: 11)

APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSEIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSV
HEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-32 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 12)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSEIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-33

FS18-7-33 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-33 ansa CD - SNGQPEDNY (SEQ ID NO: 13)

FS18-7-33 ansa EF - PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-33 (SEQ ID NO:
0 14)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-33 (SEQ ID NO:
15)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-33,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 16)

APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-33 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 17)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-36

FS18-7-36 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-36 ansa CD - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 18)

5 FS18-7-36 ansa EF - PYDRWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-36 (SEQ ID NO:

19)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TACTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
T

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-36 (SEQ ID NO:

0 20)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSYFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di CH2+CH3 e domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-

36, comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 21)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSYFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-36 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 22)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSYFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-58

FS18-7-58 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-58 ansa CD - SNGYPEIEF (SEQ ID NO: 23)

FS18-7-58 ansa EF - PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-58 (SEQ ID NO: 24)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGTATCCAGAAATCGAATCAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

5

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-58 (SEQ ID NO: 25)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-58,

comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO:26)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

0

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-58 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 27)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-62

5 FS18-7-62 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-62 ansa CD - SNGIPEWNY (SEQ ID NO: 28)

FS18-7-62 ansa EF - PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-62 (SEQ ID NO: 29)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGATCCCAGAATGGAActATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-62 (SEQ ID NO:
30)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-62,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 31)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-62 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 32)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-65

FS18-7-65 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-65 ansa CD - SNGYAEYNY (SEQ ID NO: 33)

FS18-7-65 ansa EF - PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3)

5 Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-65 (SEQ ID NO: 34)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGATGCAGAATATAACTATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-65 (SEQ ID NO: 35)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-65, comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 36)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-65 senza

5 mutazione LALA (SEQ ID NO: 37)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-78

FS18-7-78 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-78 ansa CD - SNGYKEENY (SEQ ID NO: 38)

0 FS18-7-78 ansa EF - PYDRWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-78 (SEQ ID NO: 39)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGTATAAAGAAGAAACTATAAGACCAGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-78 (SEQ ID NO: 40)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-78,

comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 41)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-78 senza

mutazione LALA (SEQ ID NO: 42)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-88

FS18-7-88 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-88 ansa CD - SNGVPELNV (SEQ ID NO: 43)

5 FS18-7-88 ansa EF - PYDRWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-88 (SEQ ID NO: 44)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGTTCCAGAACTGAACGTTAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-88 (SEQ ID NO: 45)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

0 Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-88,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 46)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVMHE
EALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-88 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 47)

5 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWPDEFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

Sequenze amminoacidiche delle regioni ad ansa di Fcab FS18-7-95

FS18-7-95 ansa AB - WDEPWGED (SEQ ID NO: 1)

FS18-7-95 ansa CD - SNGYQEDNY (SEQ ID NO: 48)

FS18-7-95 ansa EF - PYDRWWPDE (SEQ ID NO: 3)

Sequenza nucleotidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-95 (SEQ ID NO: 49)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGGTGAA
GACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGTATCAGGAAGATAACTATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGATGATAGGTGGGTTTGGCCGGATGAGTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequenza amminoacidica del dominio CH3 di Fcab FS18-7-95 (SEQ ID NO: 50)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYDRWWWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-95,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 51)

APEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYR^WSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGED
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica dei domini CH2 e CH3 di Fcab FS18-7-95 senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 52)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYR^WSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDV
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWWPDEFSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

0

Sequenza amminoacidica del dominio CH2 di IgG1 umana wild-type (SEQ ID
NO: 53)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYR^WSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

Sequenza amminoacidica del dominio CH2 di IgG1 umana comprendente la

5 "mutazione LALA" (sottolineata) (SEQ ID NO: 54)

APEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYR^WSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab "wild-type" senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 55).

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di domini CH2 e CH3 di Fcab "wild-type",
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 56)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica della regione cerniera di IgG1 umana (SEQ ID NO:
57)

EPKSCDKTHTCPPCP

Sequenza amminoacidica della regione cerniera troncata di IgG1 umana
(SEQ ID NO: 58)

0 TCPPCP

Sequenza amminoacidica di Fcab anti-LAG-3 murino FS18-7-108-29,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 59)

*Il dominio CH3 è mostrato in corsivo. Le anse AB, CD e EF del dominio
CH3 sono mostrate in grassetto e sottolineate.*

5 TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPFERWMMWPDEFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di Fcab anti-LAG-3 murino FS18-7-108-29, senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 60)

*Il dominio CH3 è mostrato in corsivo. Le anse AB, CD e EF del dominio
CH3 sono mostrate in grassetto e sottolineate.*

0 TCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPFERWMMWPDEFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di Fcab anti-LAG-3 murino FS18-7-108-35,
comprendente mutazione LALA (sottolineata) (SEQ ID NO: 61)

Il dominio CH3 è mostrato in corsivo. Le regioni ad ansa AB, CD e EF sono mostrate in grassetto e sottolineate.

5 TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDISEVEESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica di Fcab anti-LAG-3 murino FS18-7-108-35, senza
mutazione LALA (SEQ ID NO: 62)

Il dominio CH3 è mostrato in corsivo. Le regioni ad ansa AB, CD e EF sono mostrate in grassetto e sottolineate.

0 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEP
WGEDVSLTCLVKGFYPSDISEVEESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano
FS18-7-9/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 63)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVKLD~~ET~~GGGLVQGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWWRSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano
FS18-7-9/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 64)

0 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLS~~CVASGFTFSDYWMN~~WVRQ~~SPEKGLEW~~WAQIRNKPYNYET~~YYS~~DS~~
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVT~~VSSASTKGPSV~~FPLAP~~
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGAL~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TV~~PSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV~~VVD~~
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~NGQPENNY~~KTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWVWPDEF~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSL~~SLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-32/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 65)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLS~~CVASGFTFSDYWMN~~WVRQ~~SPEKGLEW~~WAQIRNKPYNYET~~YYS~~DS~~
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVT~~VSSASTKGPSV~~FPLAP~~
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGAL~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TV~~PSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA~~E~~AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV~~V~~
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPS~~E~~IAVEWES~~NGQPENNY~~KTTTPVL
VLDSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWVWPDEF~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSL~~SLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-32/ senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 66)

0 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLS~~CVASGFTFSDYWMN~~WVRQ~~SPEKGLEW~~WAQIRNKPYNYET~~YYS~~DS~~
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVT~~VSSASTKGPSV~~FPLAP~~
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGAL~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TV~~PSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV~~VVD~~
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPS~~E~~IAVEWES~~NGQPENNY~~KTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWVWPDEF~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSL~~SLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-33/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 67)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è*

in grassetto.

EVKLD**ETGGGLVQ**GRPMKLSCVAS**GFTFSDYWMN**WWRQSPEKGLEW**WAQIRNKPYNYET**YYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN**NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDY**WGQGT**SVTVSSASTK**GPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP**VTVSWNSGAL**TS**GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQT**
YICNVNHKPSNTKVDK**KVEPKSCDK**HTC**PPCPAPEAAGG**PSVFL**FPPKPKDTL**MISRTPEVTCV**WV**
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK**TKPREEQYN**STYRVVSVLTVLH**QDWLNGKEYKCKV**SNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVY**TLPPSWDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGQPEDNY**KTT**PP**
VLDS**DGSFFLYSKLTPYDRWWPDEF**SCSV**MHEALHNHYTQKSL**SLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

5 FS18-7-33/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 68)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLD**ETGGGLVQ**GRPMKLSCVAS**GFTFSDYWMN**WWRQSPEKGLEW**WAQIRNKPYNYET**YYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN**NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDY**WGQGT**SVTVSSASTK**GPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP**VTVSWNSGAL**TS**GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQT**
YICNVNHKPSNTKVDK**KVEPKSCDK**HTC**PPCPAPELLGG**PSVFL**FPPKPKDTL**MISRTPEVTCV**WVD**
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK**TKPREEQYN**STYRVVSVLTVLH**QDWLNGKEYKCKV**SNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVY**TLPPSWDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGQPEDNY**KTT**PP**
V**SDGSFFLYSKLTPYDRWWPDEF**SCSV**MHEALHNHYTQKSL**SLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

0 FS18-7-36/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 69)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD**ETGGGLVQ**GRPMKLSCVAS**GFTFSDYWMN**WWRQSPEKGLEW**WAQIRNKPYNYET**YYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN**NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDY**WGQGT**SVTVSSASTK**GPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP**VTVSWNSGAL**TS**GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQT**
YICNVNHKPSNTKVDK**KVEPKSCDK**HTC**PPCPAPEAAGG**PSVFL**FPPKPKDTL**MISRTPEVTCV**WV**
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK**TKPREEQYN**STYRVVSVLTVLH**QDWLNGKEYKCKV**SNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVY**TLPPSWDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGQPENNY**KTT**PP**
VLDS**DGSYFLYSKLTPYDRWWPDEF**SCSV**MHEALHNHYTQKSL**SLSPG

5 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-36/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 70)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF

sono in grassetto e sottolineate.

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWQAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGQPENNY**KTTTPVL
DSDGSYFLYSKLT**VPYDRWWWPDE**FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-58/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 71)

- 5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWQAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGYPEIEF**KTTTPVL
LSDGSFFLYSKLT**VPYDRWWWPDE**FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

- 0 FS18-7-58/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 72)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWQAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGYPEIEF**KTTTPVLD
SDGSFFLYSKLT**VPYDRWWWPDE**FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

- 5 FS18-7-62/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 73)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF

sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD~~ETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDK~~KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA~~AGG~~PSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVW~~
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYK~~TTTP
VLDS~~DGSFFLYSKLTPYDRWWPDEF~~SCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPG~~

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

5 FS18-7-62/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 74)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLD~~ETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDK~~KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVWD~~
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYK~~TTTPVL
DSDG~~SFFLYSKLTPYDRWWPDEF~~SCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPG~~

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

0 FS18-7-65/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 75)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD~~ETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDK~~KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA~~AGG~~PSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVWV~~
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYK~~TTTP
VLDS~~DGSFFLYSKLTPYDRWWPDEF~~SCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPG~~

5 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-65/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 76)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLD~~ETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEW~~WAQIRNKPYNYET~~YSDS
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PPSSSLGTQT~~
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~SNGYAEYNYK~~TTTPVL
DSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWVWPDEF~~SCSVMH~~EALHNHYTQKSL~~SLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

5 FS18-7-78/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 77)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD~~ETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEW~~WAQIRNKPYNYET~~YSDS
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PPSSSLGTQT~~
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~SNGYKEENYK~~TTTP
VLDS~~DGSFFLYSKLTV~~~~PYDRWVWPDEF~~SCSVMH~~EALHNHYTQKSL~~SLSPG

0 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-78/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 78)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLD~~ETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEW~~WAQIRNKPYNYET~~YSDS
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PPSSSLGTQT~~
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~SNGYKEENYK~~TTTPVL
DSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWVWPDEF~~SCSVMH~~EALHNHYTQKSL~~SLSPG

5 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-88/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 79)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLS~~CVASGFTFSDYWMN~~WVRQS~~PEKGLEW~~WAQIRNKPYNYETY~~YSDS
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT~~SVTVSSASTKGPSVF~~PLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGAL~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~VPSSSLGT~~QT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGVPELNVK**TTTP
VLDSGDSFFLYSKLTV**PYDRWWPDEF**FSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKSLSLSPG

- 5 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano FS18-7-88/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 80)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLS~~CVASGFTFSDYWMN~~WVRQS~~PEKGLEW~~WAQIRNKPYNYETY~~YSDS
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT~~SVTVSSASTKGPSVF~~PLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGAL~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~VPSSSLGT~~QT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGVPELNVK**TTTPVL
DSDGDSFFLYSKLTV**PYDRWWPDEF**FSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKSLSLSPG

- 0 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano FS18-7-95/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 81)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLS~~CVASGFTFSDYWMN~~WVRQS~~PEKGLEW~~WAQIRNKPYNYETY~~YSDS
VKGRFTISR~~DDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT~~SVTVSSASTKGPSVF~~PLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGAL~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~VPSSSLGT~~QT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGYQEDNYK**TTTP
VLDSGDSFFLYSKLTV**PYDRWWPDEF**FSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKSLSLSPG

5

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC umano

FS18-7-95/4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 82)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**SNGYQEDNY**KTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTV**PYDRWVWPDEF**SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb anti-FITC 4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 83)

La posizione delle CDR è sottolineata. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

0 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb anti-FITC 4420 senza mutazione LALA (SEQ ID NO: 84)

La posizione delle CDR è sottolineata.

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena leggera di mAb anti-FITC 4420 (SEQ

5 ID NO: 85)

La posizione delle CDR è sottolineata.

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDFR
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequenze amminoacidiche delle CDR dell'anticorpo anti-PD-L1 84G09

(secondo IMGT)

HCDR1	GFTFDDYA	(SEQ ID NO: 86)
HCDR2	ISWKSNI	(SEQ ID NO: 87)
HCDR3	ARDITGSGSYGWFD	(SEQ ID NO: 88)
LCDR1	QSISSY	(SEQ ID NO: 89)
LCDR2	VAS	(SEQ ID NO: 90)
LCDR3	QQSYSNPIT	(SEQ ID NO: 91)

5 Sequenze amminoacidiche delle CDR dell'anticorpo anti-PD-L1 84G09

(secondo Kabat)

HCDR1	DYAMH	(SEQ ID NO: 136)
HCDR2	GISWKSNIIGYADSVKG	(SEQ ID NO: 137)
HCDR3	DITGSGSYGWFD	(SEQ ID NO: 138)
LCDR1	RASQSISSYLN	(SEQ ID NO: 139)
LCDR2	VASSLQS	(SEQ ID NO: 140)
LCDR3	QQSYSNPIT	(SEQ ID NO: 141)

Sequenza amminoacidica del dominio VH di anticorpo anti-PD-L1 84G09

(SEQ ID NO: 92)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGTLVTVSS

Sequenza amminoacidica del dominio VL di anticorpo anti-PD-L1 84G09

(SEQ ID NO: 93)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKPLIYVASSLQSGVPSSFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYQCQSYSNPITFGQGTRLEIK

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-9/84G09

5 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 94)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSG**ISWKSNI**IGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGW**FDP**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPE**AAG**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVE**WESNGQPENNY**KTTPVLDSDGSFFLYSKLTP**PYDRWWPDE**FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

0 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1

umano FS18-7-9/84G09 (SEQ ID NO: 95)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSG**ISWKSNI**IGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGW**FDP**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAP**ELLG**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSDIAVE**WESNGQPENNY**KTTPVLDSGDSFFLYSKLTP**PYDRWWPDE**FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-32/84G09

con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 96)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWWRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL

APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFPSEIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-32/84G09 (SEQ ID NO: 97)

- 5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWWRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFPSEIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-33/84G09 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 98)

- 0 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWWRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFPSEIAVEWESNGQPEDNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-33/84G09 (SEQ ID NO: 99)

- 5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-36/84G09 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 100)

- 5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSYFLYKSLTVPYDRWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-36/84G09 (SEQ ID NO: 101)

- 0 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSYFLYKSLTVPYDRWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-58/84G09

- 5 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 102)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è

in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFD~~DP~~WGQGLT~~LV~~VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWWPDEF~~FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1

umano FS18-7-58/84G09 (SEQ ID NO: 103)

- 5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFD~~DP~~WGQGLT~~LV~~VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWWPDEF~~FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-62/84G09

con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 104)

- 0 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFD~~DP~~WGQGLT~~LV~~VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGED~~VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTT~~PP~~VLDSDGSFFLYSKLTV~~PYDRWWPDEF~~FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1

- 5 umano FS18-7-62/84G09 (SEQ ID NO: 105)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF

sono in grassetto e sottolineate.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-65/84G09

con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 106)

- 5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1

- 0 umano FS18-7-65/84G09 (SEQ ID NO: 107)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-78/84G09

- 5 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 108)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF

sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1

5 umano FS18-7-78/84G09 (SEQ ID NO: 109)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

0 Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-88/84G09
con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 110)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELVKTT
5 PPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1

umano FS18-7-88/84G09 (SEQ ID NO: 111)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDWPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-95/84G09

5 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 112)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDWPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTT
PPVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

0 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1 umano FS18-7-95/84G09 (SEQ ID NO: 113)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDWPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTPYDRWWWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5

Sequenza amminoacidica del mAb anti-PD-L1 umano 84G09 con catena pesante

e LALA (SEQ ID NO: 114)

La posizione delle CDR è sottolineata. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb anti-PD-L1 umano 84G09

(SEQ ID NO: 115)

La posizione delle CDR è sottolineata.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWWSGISWKSNIIGYADSVKG
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena leggera di mAb anti-PD-L1 umano 84G09

0 (SEQ ID NO:116)

La posizione delle CDR è sottolineata.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISYLNWYQQKPKAPKPLIYVASSLQSGVPSFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSNPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEHKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 murino FS18-7-108-29/S1

con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO: 117)

5 La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVFERWMPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1 murino FS18-7-108-29/S1 (SEQ ID NO:118)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESNGQPENNYKTTPPV
DSDGDSFFLYSKLTVFERWMPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena leggera di mAb anti-PD-L1 murino S1 (SEQ ID NO:119)

La posizione delle CDR è sottolineata.

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLFPTPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
0 SPVTKSFNRGEC

Sequenza amminoacidica del mAb² anti-LAG-3/PD-L1 murino FS18-7-108-35/S1 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO:120)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGSSFFLYSKLTVPFERWMPDEFFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/PD-L1 murino FS18-7-108-35/S1 (SEQ ID NO:121)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWAWSPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCCARRHWPGGFDYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSSFFLYSKLTVPFERWMPDEFFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica del mAb di controllo contro PD-L1 S1 con catena pesante e mutazione LALA (SEQ ID NO:122)

0 *La posizione delle CDR è sottolineata. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWAWSPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCCARRHWPGGFDYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
LDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante del mAb di controllo contro PD-L1 S1 (SEQ ID NO:123)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWAWSPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCCARRHWPGGFDYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
SDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQ
PDSGPPAAAPGHPPVPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRG
DFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWILNCSFSRPDR
PASVHWFRSRGQGRVPVQGSPPHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGL
EPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAPPGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSQLAQA
GTYICHIRLQGGQLNATVTLAITVTPKSFSGPSGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGP
WLEAQEAQLLSQPWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHLPLFLILGVLFLLL
LVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEP
EQL

Sequenza amminoacidica di PD-L1 umano (SEQ ID NO: 129)

5

MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV
HGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY
NKNQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTT
TNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKK
CGIQDTNSKKQSDTHLEET

Sequenza amminoacidica di PD-L1 murino (SEQ ID NO: 130)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFV
AGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKNAPYR
KINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSTRTEGMLLNVTSSLRVNATA
NDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPATHPPQNRTHWLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVE
KCGVEDTSSKNRNDTQFEET

Sequenza amminoacidica di PD-L1 di cinomolgo (SEQ ID NO: 131)

MRIFAVFIFTIYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVH
GEECLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYN
KINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTA
NEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTHLVILGAILLGLGVALTFIFYLKGRMMDMKKCG
IRVTNSKKQRDTQLEET

0

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC murino FS18-7-108-29/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 132)

La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSD
SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT~~SVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDK~~KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT~~
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLN~~NGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVVEWES~~NGQPENN
YKTTPPVLDS~~DGSFFLYSKLTV~~PFERWMWPDEFSCSV~~MHEALHNH~~YHTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC murino FS18-7-108-35/4420 comprendente mutazione LALA (SEQ ID NO: 133)

5 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate. La posizione della mutazione LALA è in grassetto.*

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSD
SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT~~SVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDK~~KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT~~
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLN~~NGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDISVEWES~~NGQPENN
YKTTPPVLDS~~DGSFFLYSKLTV~~PFERWMWPDEFSCSV~~MHEALHNH~~YHTQKSLSLSPG

Sequenza amminoacidica della catena pesante di mAb² anti-LAG-3/FITC murino FS18-7-108-29/4420 (SEQ ID NO: 134)

0 *La posizione delle CDR è sottolineata e le sequenze di ansa AB, CD e EF sono in grassetto e sottolineate.*

EVKLD~~ETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWRQ~~SPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYSD
SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN~~NLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT~~SVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDK~~KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC~~
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLN~~NGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS~~WDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVVEWES~~NGQPENNY
KTT~~PPVLDS~~~~DGSFFLYSKLTV~~PFERWMWPDEFSCSV~~MHEALHNH~~YHTQKSLSLSPG

Riferimenti

5 Bae J, Lee SJ, Park CG, Lee YS, Chun T. Trafficking of LAG-3 to the surface on activated T cells via its cytoplasmic domain and protein

- kinase C signaling. *J Immunol.* 193(6),3101-12 (2014).
- Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 176(8),4622-31 (2006).
- 5 Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De Filippo A, Triebel F, Parmiani G, Belli F, Rivoltini L, Castelli C. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol.* 184(11),6545-51 (2010).
- Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination
0 blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(9),4275-80 (2010).
- Demeure, C. E., Wolfers, J., Martin-Garcia, N., Gaulard, P. & Triebel, F. T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class
5 II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell-cell contacts. *European journal of cancer* 37, 1709-1718 (2001).
- Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, Drake CG. Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T
0 cells to be suppressed in vivo. *PLoS One.* 9(11), e109080 (2015).
- Engels B, Engelhard VH, Sidney J, Sette A, Binder DC, Liu RB, Kranz DM, Meredith SC, Rowley DA, Schreiber H. Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell.* 23(4),516-26 (2013).
- 5 Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, Elliott S, Gill D, Marlton P, Seymour J, Khanna R. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating

- lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 108(7),2280-9 (2006).
- Grosso J, Inzunza D, Wu Q, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 1 (Suppl 1):P53. (2013).
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrín A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515(7528),563-7 (2014).
- Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94,5744-9 (1997).
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(19),12293-7.
- Jing W, Gershan JA, Weber J, Tlomak D, McOlash L, Sabatos-Peyton C, Johnson BD1. Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. *J Immunother Cancer*. 3(1):2 (2015).
- Kabat, E.A. et al., In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. NIH Publication, 91-3242 (1991).
- Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 373(13),1270-1 (2015).

Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. Proc Natl Acad Sci USA 94,5744-9 (1997).

5 Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithwaite FS, Loriot Y, Cruz C, Bellmunt J, Burris HA, Petrylak DP, Teng SL, Shen X, Boyd Z, Hegde PS, Chen DS, Vogelzang NJ. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature. 515(7528),558-62 (2014).
0 Segal EI, Leveson-Gower DB, Florek M, Schneidawind D, Luong RH, Negrin RS. Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation. PLoS One. 9(1), e86551 (2014).

Wolchok J et al; Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med. 369(2),122-33 (2013).

5 Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tangsombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG, Vignali DA. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. Cancer Res. 72(4),917-2 (2012).

0 Operaio CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). J Immunol. 2005 Jan 15;174(2):688-95.

5 Operaio CJ, Vignali DA. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. Eur J Immunol. 2003 Apr; 33(4):970-9.

RIVENDICAZIONI

1. Molecola anticorpale che si lega al ligando di morte programmata 1 (PD-L1) e al gene di attivazione dei linfociti 3 (LAG-3), in cui la molecola anticorpale comprende:

- 5 (i) un sito legante l'antigene basato sulla regione determinante la complementarità (CDR) per PD-L1 comprendente le CDR esposte in SEQ ID NO da 86 a 91; e
- (ii) un sito legante l'antigene LAG-3 situato in un dominio CH3 della molecola anticorpale, in cui il sito legante LAG-3 comprende le sequenze amminoacidiche WDEPWGED (SEQ ID NO: 1) e PYDRWVWPDE (SEQ ID NO: 3), e in cui la sequenza amminoacidica WDEPWGED è situata nell'ansa AB del dominio CH3 e la sequenza amminoacidica PYDRWVWPDE è situata nell'ansa EF del dominio CH3.

2. Molecola anticorpale secondo la Rivendicazione 1, in cui il sito legante l'antigene LAG-3 comprende inoltre una delle seguenti sequenze nell'ansa CD del dominio CH3:

- 5 (i) SNGQPENNY (SEQ ID NO 2, 8 e 18);
- (ii) SNGQPEDNY (SEQ ID NO: 13);
- (iii) SNGYPEIEF (SEQ ID NO: 23);
- 0 (iv) SNGIPEWNY (SEQ ID NO: 28);
- (v) SNGYAEYNY (SEQ ID NO: 33);
- (vi) SNGYKEENY (SEQ ID NO: 38);
- (vii) SNGVPELNV (SEQ ID NO: 43); o
- (viii) SNGYQEDNY (SEQ ID NO: 48);

5 preferibilmente in cui il sito legante l'antigene LAG-3 comprende

la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2, 28 o 38, preferibilmente in cui il sito legante l'antigene LAG-3 comprende la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 2.

3. Molecola anticorpale secondo la Rivendicazione 1 o 2, in cui la molecola anticorpale è una molecola di immunoglobuline G (IgG), preferibilmente una molecola di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferibilmente una molecola di IgG1.
4. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 3, in cui la molecola anticorpale comprende il dominio CH3 esposto in SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, preferibilmente SEQ ID NO: 5, 30, o 40, preferibilmente SEQ ID NO: 5.
5. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 4, in cui la molecola anticorpale comprende un dominio CH2 e il dominio CH2 ha la sequenza esposta in SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.
6. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 5, in cui la molecola anticorpale comprende la sequenza esposta in SEQ ID NO: 6, 7, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 41, 42, 46, 47, 51 o 52, preferibilmente SEQ ID NO: 6, 7, 31, 32, 41 o 42, preferibilmente SEQ ID NO: 6 o 7.
7. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 6, in cui la molecola anticorpale comprende i domini VH e/o VL esposti in SEQ ID NO 92 e 93.
8. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 7, in cui la molecola anticorpale comprende la sequenza di

catena pesante esposta in una qualsiasi di SEQ ID NO: da 94 a 113, preferibilmente SEQ ID NO: 94, 95, 104, 105, 108 o 109, preferibilmente SEQ ID NO: 94 o 95.

- 5 9. Molecola anticorpale secondo la Rivendicazione 7 o 8, in cui la molecola anticorpale comprende la sequenza di catena leggera esposta in SEQ ID NO: 116.
10. Molecola anticorpale secondo la Rivendicazione 9, in cui la molecola anticorpale comprende la sequenza di catena pesante esposta in SEQ ID NO: 94 e la sequenza di catena leggera esposta in SEQ ID NO: 116.
- 0 11. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 10, in cui la molecola anticorpale è coniugata a un modulatore del sistema immunitario, molecola citotossica, radioisotopo, o marcatore rilevabile, in cui facoltativamente il modulatore del sistema immunitario o molecola citotossica è una citochina.
- 5 12. Acido nucleico codificante per una molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 11, o un vettore comprendente un acido nucleico codificante per una molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 11.
- 0 13. Cellula ospite ricombinante comprendente l'acido nucleico o il vettore secondo la Rivendicazione 12.
14. Metodo per produrre una molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 11, comprendente la coltivazione della cellula ospite ricombinante secondo la Rivendicazione 13 in condizioni di produzione della molecola anticorpale, in cui il metodo comprende facoltativamente inoltre l'isolamento e/o la
- 5

purificazione della molecola anticorpale.

15. Composizione farmaceutica comprendente una molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 11 e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.
- 5 16. Molecola anticorpale secondo una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 11, per uso in un metodo per trattare il cancro in un paziente, facoltativamente in cui il metodo comprende inoltre la somministrazione al paziente di:
- 0 (a) un vaccino antitumorale; o
- (b) un agente chemioterapico.

*è traduzione con la
dell'origine
della capsula*

TRADUZIONE DELLE FIGURE

<u>Figure 1</u>	<u>Figura 1</u>
A	A
CH3	CH3
AB	AB
CD	CD
FS#	FS#
CH3	CH3
EF	EF
FS#	FS#
<u>Figure 1 continued</u>	<u>Figura 1 continua</u>
B	B
Fcab	Fcab
Identity to FS18-7-9	Identità a FS18-7-9
FS#	FS#
<u>Figure 2</u>	<u>Figura 2</u>
A	A
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 hLAG3 + LK35.2 hPD-L1	DO11.10 hLAG3 + LK35.2 hPD-L1
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA

84G09 LALA	84G09 LALA
25F7	25F7
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
B	B
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 hLAG3 + LK35.2 plvx	DO11.10 hLAG3 + LK35.2 plvx
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA
84G09 LALA	84G09 LALA
25F7	25F7
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
C	C
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 plvx + LK35.2 hPD-L1	DO11.10 plvx + LK35.2 hPD-L1
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA
84G09 LALA	84G09 LALA
25F7	25F7
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA

cev

25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
<u>Figure 2 continued</u>	<u>Figura 2 continua</u>
D	D
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 hLAG3 + LK35.2 hPD-L1	DO11.10 hLAG3 + LK35.2 hPD-L1
FS18-7-62/4420 LALA	FS18-7-62/4420 LALA
FS18-7-62/84G09LALA	FS18-7-62/84G09LALA
FS18-7-62/4420LALA + 84G09 LAL	FS18-7-62/4420LALA + 84G09 LAL
FS18-7-78/4420LALA	FS18-7-78/4420LALA
FS18-7-78/84G09LALA	FS18-7-78/84G09LALA
FS18-7-78/4420LALA + 84G09 LAL	FS18-7-78/4420LALA + 84G09 LAL
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
E	E
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 hLAG3 + LK35.2 plvx	DO11.10 hLAG3 + LK35.2 plvx
FS18-7-62/4420 LALA	FS18-7-62/4420 LALA
FS18-7-62/84G09LALA	FS18-7-62/84G09LALA
FS18-7-62/4420LALA + 84G09 LAL	FS18-7-62/4420LALA + 84G09 LAL
FS18-7-78/4420LALA	FS18-7-78/4420LALA
FS18-7-78/84G09LALA	FS18-7-78/84G09LALA
FS18-7-78/4420LALA + 84G09 LAL	FS18-7-78/4420LALA + 84G09 LAL
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA

[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
F	F
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 plvx + LK35.2 hPD-L1	DO11.10 plvx + LK35.2 hPD-L1
FS18-7-62/4420LALA	FS18-7-62/4420LALA
FS18-7-62/84G09LALA	FS18-7-62/84G09LALA
FS18-7-62/4420LALA + 84G09 LAL	FS18-7-62/4420LALA + 84G09 LAL
FS18-7-78/4420LALA	FS18-7-78/4420LALA
FS18-7-78/84G09LALA	FS18-7-78/84G09LALA
FS18-7-78/4420LALA + 84G09 LAL	FS18-7-78/4420LALA + 84G09 LAL
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
<u>Figure 3</u>	<u>Figura 3</u>
A	A
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 cLAG3 + LK35.2 cPD-L1	DO11.10 cLAG3 + LK35.2 cPD-L1
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA
84G09 LALA	84G09 LALA
25F7	25F7
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)

B	B
mIL-2 (pg/ml)	mIL-2 (pg/ml)
DO11.10 cLAG3 + LK35.2 plvx	DO11.10 cLAG3 + LK35.2 plvx
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA
84G09 LALA	84G09 LALA
25F7	25F7
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
C	C
A ₄₅₀₋₅₇₀	A ₄₅₀₋₅₇₀
DO11.10 plvx + LK35.2 cPD-L1	DO11.10 plvx + LK35.2 cPD-L1
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-09/4420LALA + 84G09	FS18-7-09/4420LALA + 84G09
4420 LALA	4420 LALA
84G09 LALA	84G09 LALA
25F7	25F7
25F7 + 84G09 LALA	25F7 + 84G09 LALA
25F7 + S1 LALA	25F7 + S1 LALA
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
<u>Figure 4</u>	<u>Figura 4</u>
h IFN γ (pg/ml)	h IFN γ (pg/ml)

ai

FS18-7-09/84G09LALA	FS18-7-09/84G09LALA
FS18-7-33/84G09LALA	FS18-7-33/84G09LALA
FS18-7-78/84G09LALA	FS18-7-78/84G09LALA
84G09 LALA	84G09 LALA
FS18-7-09/4420LALA	FS18-7-09/4420LALA
FS18-7-33/4420LALA	FS18-7-33/4420LALA
FS18-7-78/4420LALA	FS18-7-78/4420LALA
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LAL	84G09 LALA + FS18-7-09/4420LAL
84G09 LALA + FS18-7-33/4420LAL	84G09 LALA + FS18-7-33/4420LAL
84G09 LALA + FS18-7-78/4420LAL	84G09 LALA + FS18-7-78/4420LAL
4420 LALA	4420 LALA
SEB	SEB
[conc] (nM)	[concentrazione] (nM)
<u>Figure 5</u>	<u>Figura 5</u>
*p=0.0125	*p = 0,0125
grams	grammi
FS18-29/4420	FS18-29/4420
FS18-29/S1	FS18-29/S1
C9B7W + S1	C9B7W + S1
S1	S1
C9B7W	C9B7W
IgG Control	Controllo con IgG
<u>Figure 6</u>	<u>Figura 6</u>
Tumour Volume mm ³	Volume del tumore mm ³
IgG Control	Controllo con IgG

FS18-29/4420	FS18-29/4420
C9B7W	C9B7W
S1	S1
Combination of C9B7W+ S1	Combinazione di C9B7W+ S1
FS18-29/S1	FS18-29/S1
days	giorni
10mg/kg dose	Dose di 10 mg/kg
<u>Figure 7</u>	<u>Figura 7</u>
p=0.605	p = 0,605
grams	grammi
FS18-29/4420	FS18-29/4420
FS18-29/S1	FS18-29/S1
C9B7W + S1	C9B7W + S1
S1	S1
C9B7W	C9B7W
IgG Control	Controllo con IgG
<u>Figure 8</u>	<u>Figura 8</u>
Tumour Volume mm ³	Volume del tumore mm ³
FS18-29/4420	FS18-29/4420
IgG Control	Controllo con IgG
C9B7W	C9B7W
S1	S1
C9B7W+ S1	C9B7W+ S1
FS18-29/S1	FS18-29/S1
days	giorni

10mg/kg dose	Dose di 10 mg/kg
<u>Figure 9</u>	<u>Figura 9</u>
p=#	p=n.
grams	grammi
FS18-29/4420	FS18-29/4420
FS18-29/S1	FS18-29/S1
FS18-35/4420	FS18-35/4420
FS18-35/S1	FS18-35/S1
C9B7W + PD-L1	C9B7W + PD-L1
S1	S1
C9B7W	C9B7W
IgG Control	Controllo con IgG
<u>Figure 10</u>	<u>Figura 10</u>
Tumour Volume mm ³	Volume del tumore mm ³
IgG Control	Controllo con IgG
S1	S1
C9B7W	C9B7W
C9B7W+ S1	C9B7W+ S1
FS18-35/4420	FS18-35/4420
FS18-29/S1	FS18-29/S1
FS18-29/4420	FS18-29/4420
FS18-35/S1	FS18-35/S1
days	giorni
10mg/kg dose	Dose di 10 mg/kg

<u>Figure 11</u>	<u>Figura 11</u>
grams	grammi
FS18-29/4420 LALA	FS18-29/4420 LALA
FS18-29/4420	FS18-29/4420
FS18-29/S1 LALA	FS18-29/S1 LALA
FS18-29/S1	FS18-29/S1
FS18-29/4420 LALA + S1 LALA	FS18-29/4420 LALA + S1 LALA
FS18-29/4420 + S1 LALA	FS18-29/4420 + S1 LALA
IgG Control	Controllo con IgG
<u>Figure 12</u>	<u>Figura 12</u>
Tumour Volume mm ³	Volume del tumore mm ³
IgG Control	Controllo con IgG
FS18-29/4420LALA	FS18-29/4420LALA
FS18-29/4420	FS18-29/4420
FS18-29/S1	FS18-29/S1
FS18-29/4420 + S1	FS18-29/4420 + S1
FS18-29/4420 LALA + S1 LALA	FS18-29/4420 LALA + S1 LALA
FS18-29/4420 + S1 LALA	FS18-29/4420 + S1 LALA
FS18-29/S1 LALA	FS18-29/S1 LALA
days	giorni
10mg/kg dose	Dose di 10 mg/kg
<u>Figure 13</u>	<u>Figura 13</u>
A	A
% CD8+ LAG-3+ TILs	% CD8 + LAG-3 TIL
FS18-29/S1	FS18-29/S1

eu

FS18-29/4420	FS18-29/4420
S1	S1
FS18-29/4420 + S1	FS18-29/4420 + S1
4420	4420
Day #	Giorno n.
Time After Tumour Inoculation	Tempo dopo l'inoculazione del tumore
B	B
% CD4+ LAG-3+ TILs	% CD4 + LAG-3 TIL
FS18-29/S1	FS18-29/S1
FS18-29/4420	FS18-29/4420
S1	S1
FS18-29/4420 + S1	FS18-29/4420 + S1
4420	4420
Day #	Giorno n.
Time After Tumour Inoculation	Tempo dopo l'inoculazione del tumore
C	C
% Foxp3+ LAG-3+ TILs	% Foxp3+ LAG-3+ TIL
FS18-29/S1	FS18-29/S1
FS18-29/4420	FS18-29/4420
S1	S1
FS18-29/4420 + S1	FS18-29/4420 + S1
4420	4420
Day #	Giorno n.
Time After Tumour Inoculation	Tempo dopo l'inoculazione del tumore
<u>Figure 14</u>	<u>Figura 14</u>
A	A

% Lysis4	% di Lysis4
25F7	25F7
84G09	84G09
84G09 LALA	84G09 LALA
Rituximab	Rituximab
Rituximab LALA	Rituximab LALA
FS18-7-9/84G09	FS18-7-9/84G09
FS18-7-9/84G09 LALA	FS18-7-9/84G09 LALA
Antibody conc [nM]	Conc. di anticorpo [nM]
B	B
% Lysis4	% di Lysis4
25F7	25F7
84G09	84G09
84G09 LALA	84G09 LALA
Rituximab	Rituximab
Rituximab LALA	Rituximab LALA
FS18-7-9/84G09	FS18-7-9/84G09
FS18-7-9/84G09 LALA	FS18-7-9/84G09 LALA
Antibody conc [nM]	Conc. di anticorpo [nM]
<u>Figure 15</u>	<u>Figura 15</u>
Percent	Percentuale
4420 PD-L1	4420 PD-L1
4420 LAG-3	4420 LAG-3
RIT PD-L1	RIT PD-L1
RIT LAG-3	RIT LAG-3
25F7+84G09 PD-L1	25F7+84G09 PD-L1

25F7+84G09 LAG-3	25F7+84G09 LAG-3
FS18-7-9/84G09 PD-L1	FS18-7-9/84G09 PD-L1
FS18-7-9/84G09 LAG-3	FS18-7-9/84G09 LAG-3
Antibody conc [nM]	Conc. di anticorpo [nM]

È traduzione conforme al testo originale

WO 2017/220569

2/18

PCT/EP2017/065073

B

Fcab	Identity to FS18-7-9
FS18-7-32	99.1%
FS18-7-33	99.1%
FS18-7-36	99.1%
FS18-7-58	96.2%
FS18-7-62	98.1%
FS18-7-65	97.2%
FS18-7-78	97.2%
FS18-7-88	97.2%
FS18-7-95	97.2%

Figure 1 continued

10

WO 2017/220569

PCT/EP2017/065073

3/18

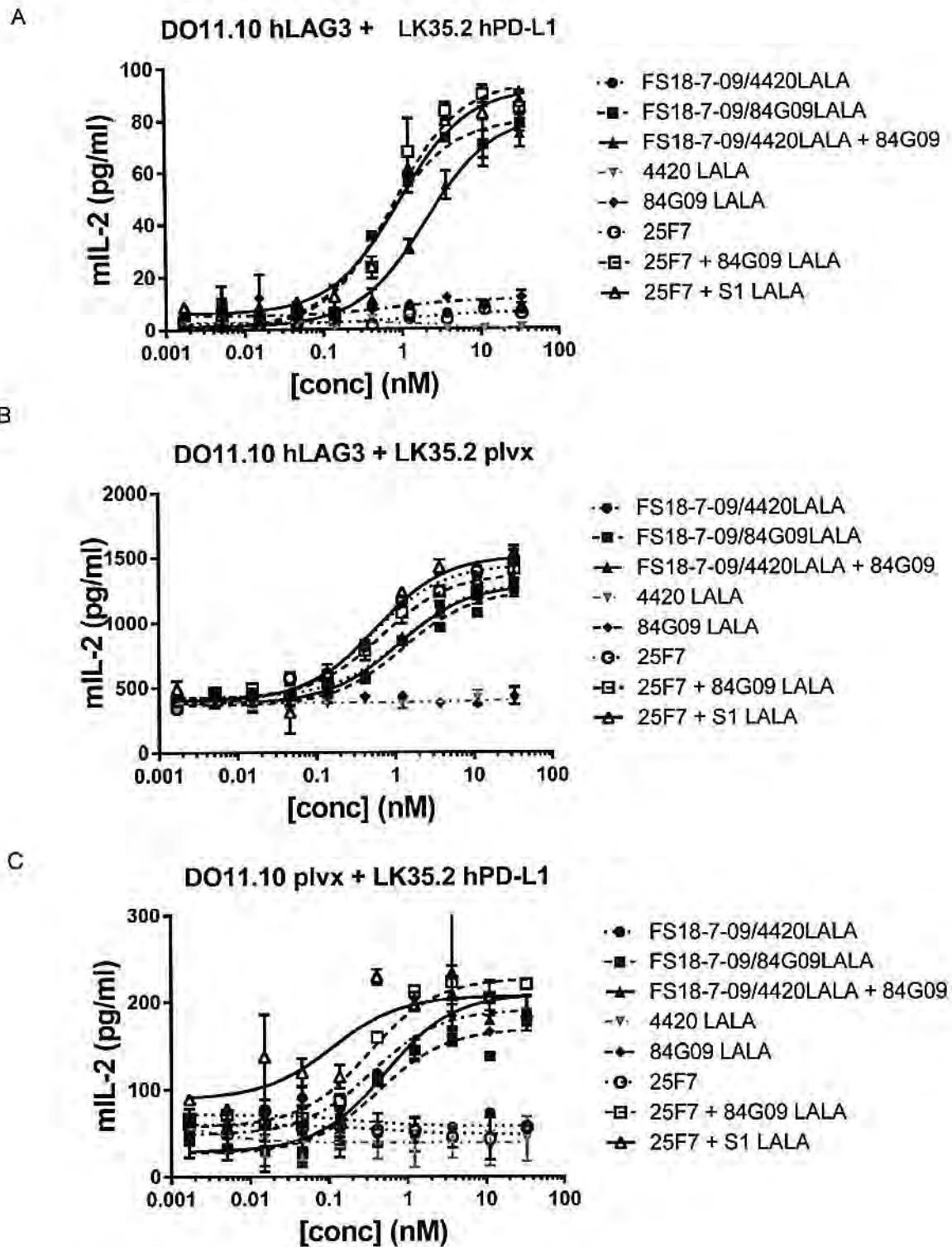


Figure 2

e/

WO 2017/220569

PCT/EP2017/065073

4/18

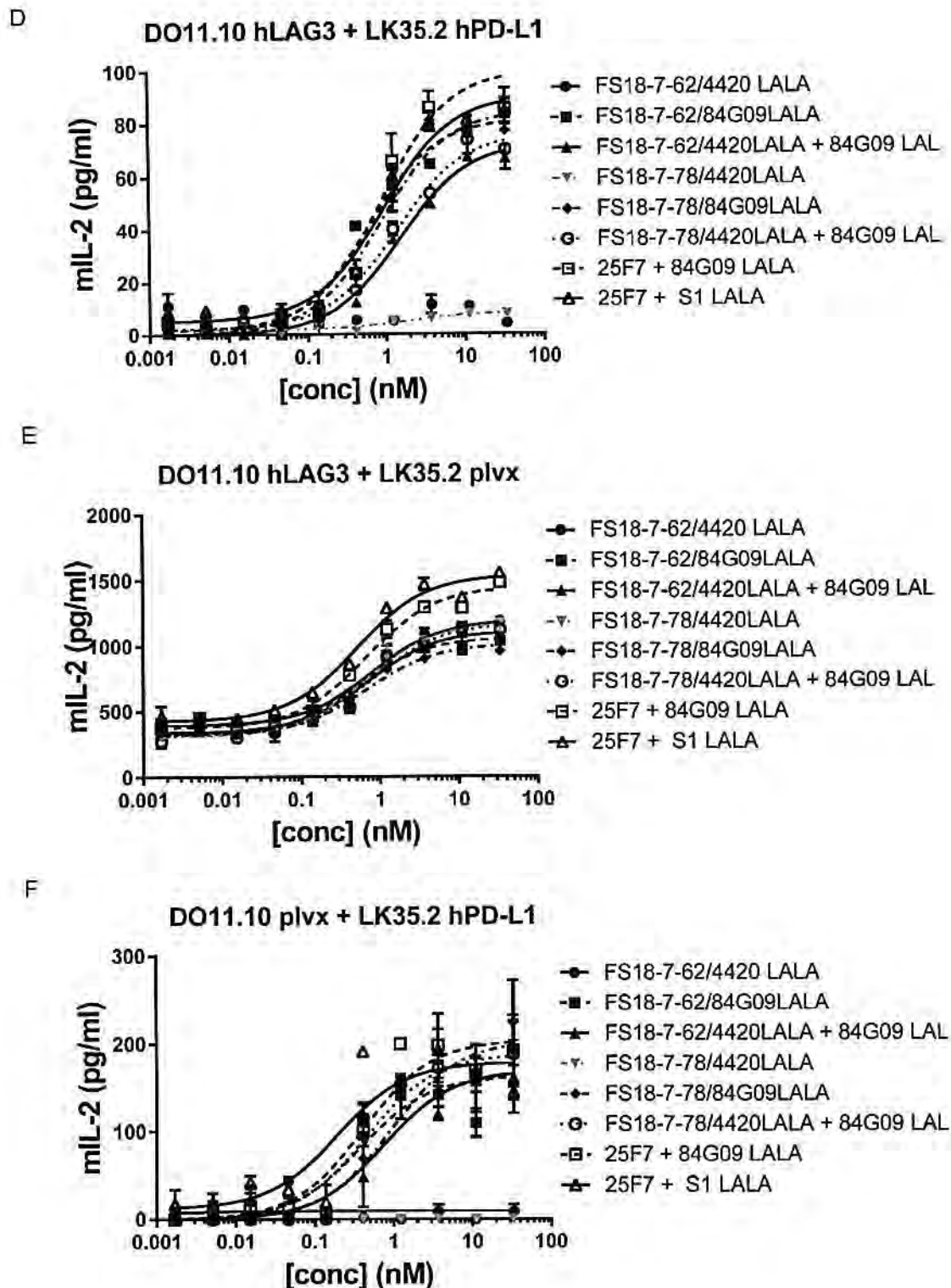


Figure 2 continued

WO 2017/220569

5/18

PCT/EP2017/065073

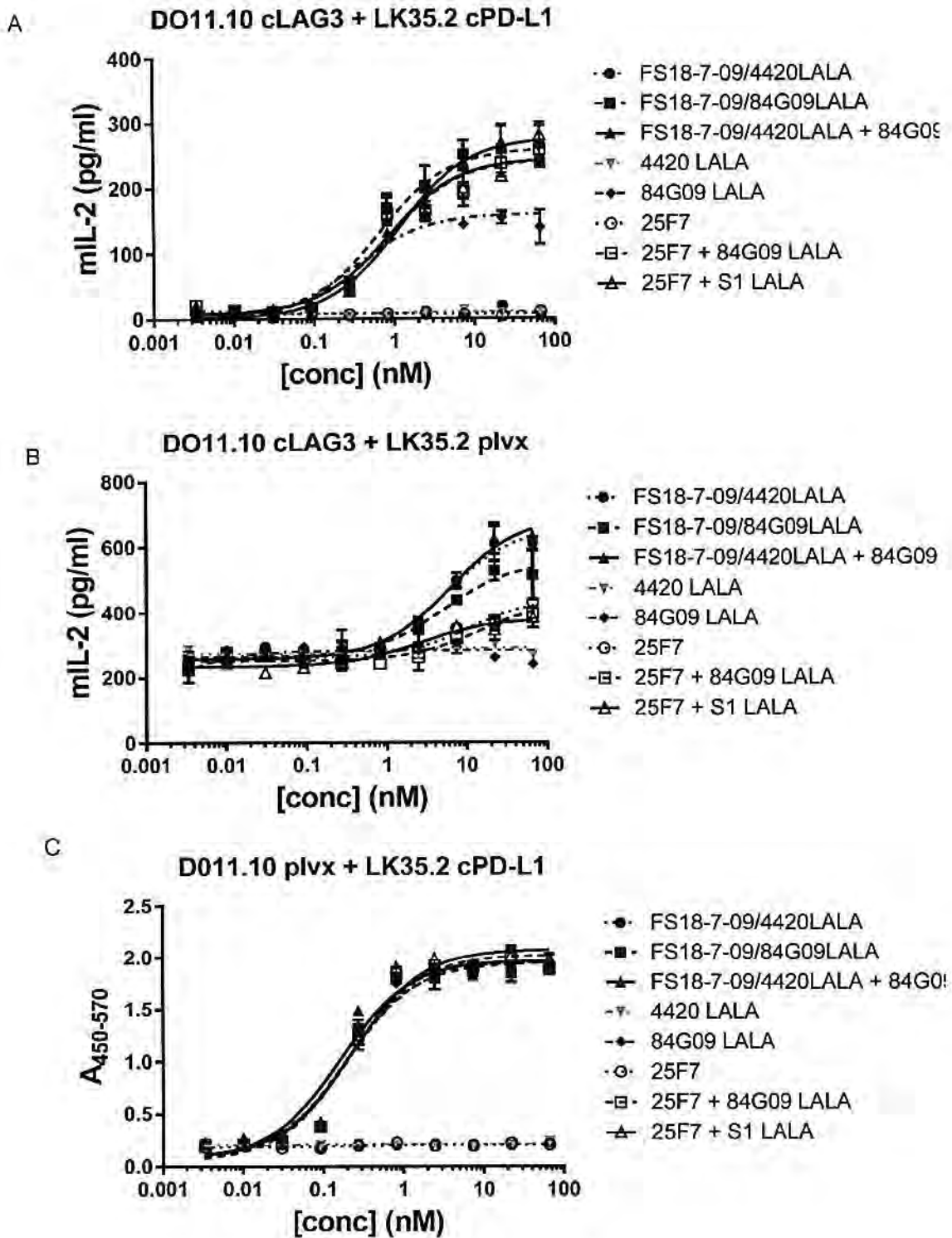


Figure 3

Ar

WO 2017/220569

PCT/EP2017/065073

6/18

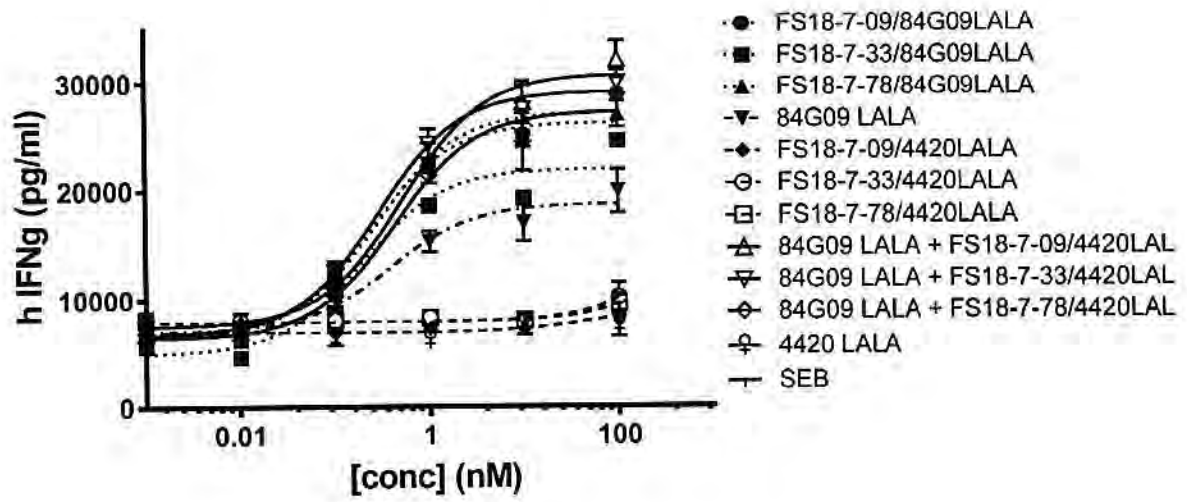


Figure 4

Ar

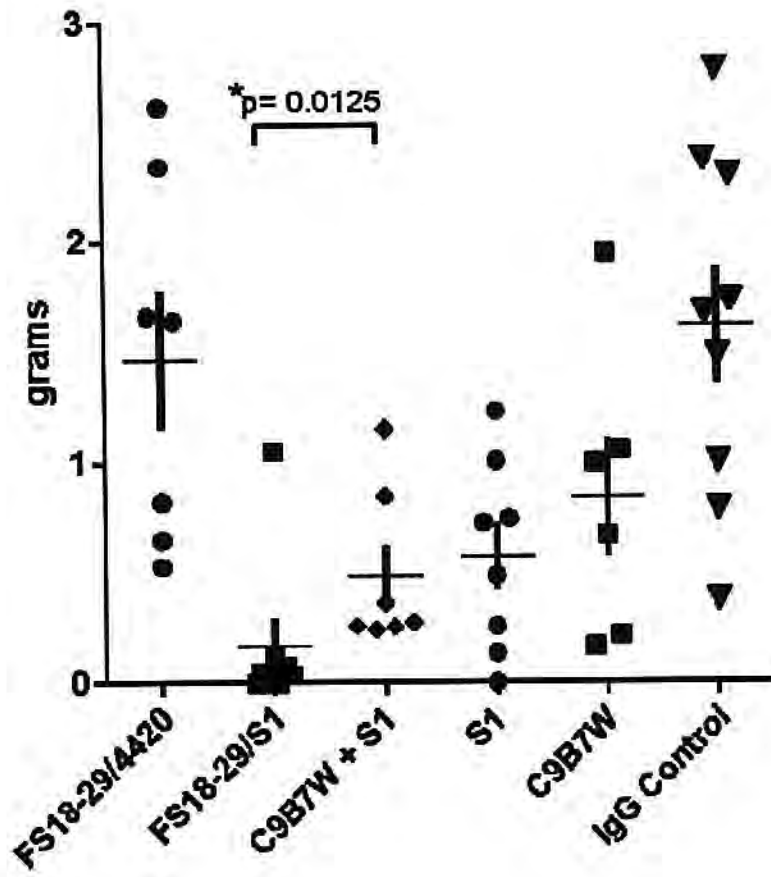


Figure 5

dc

WO 2017/220569

8/18

PCT/EP2017/065073

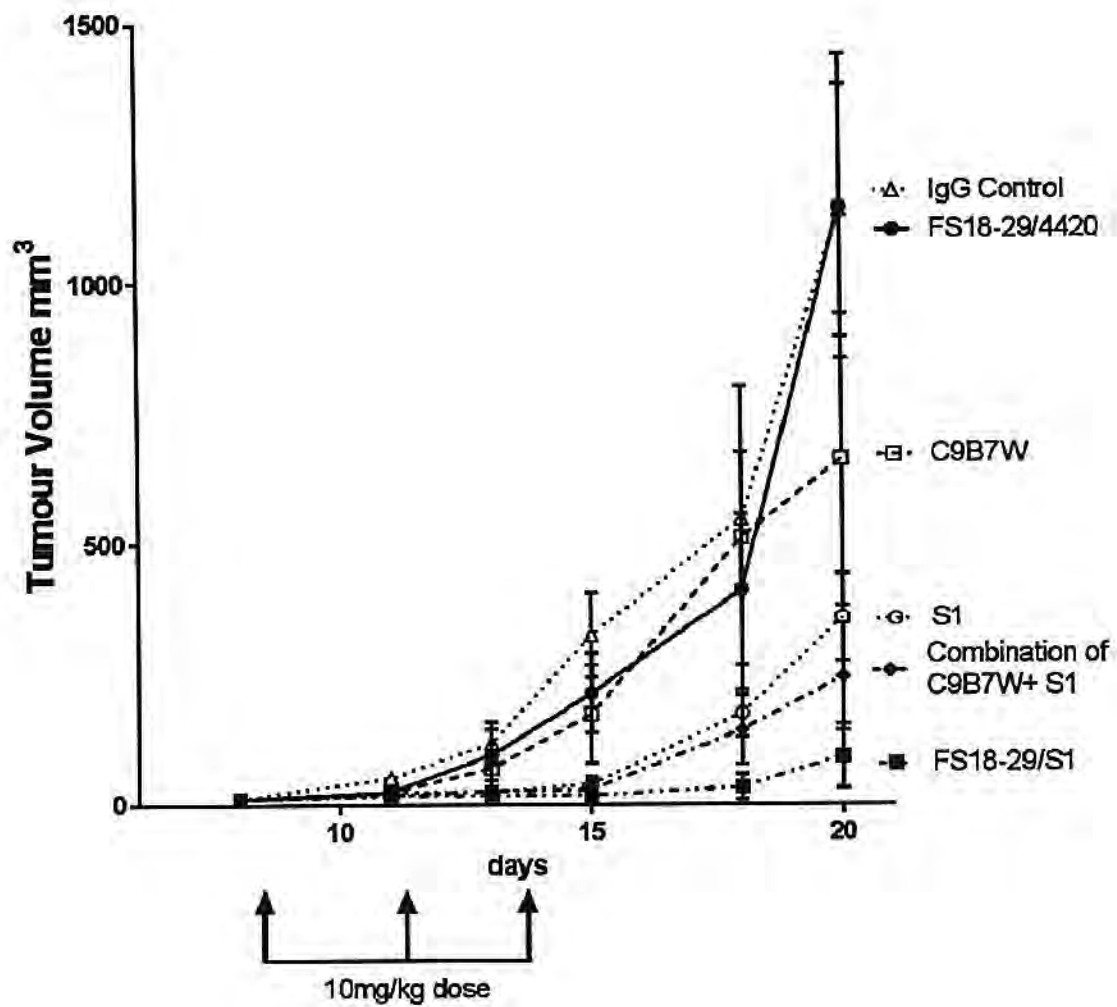


Figure 6

Br

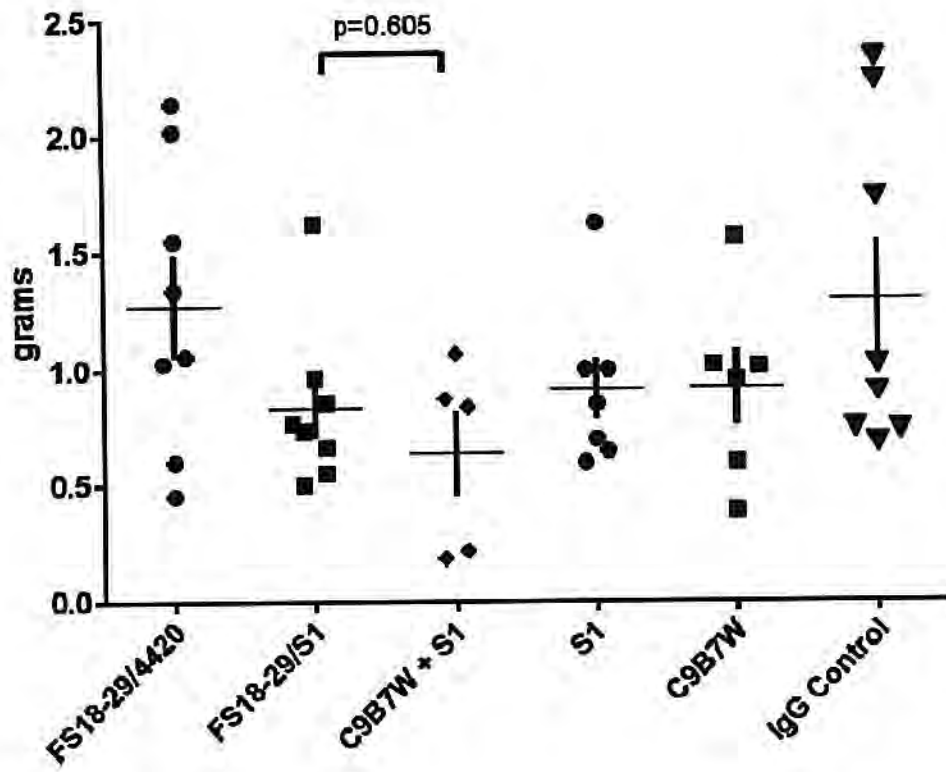


Figure 7

Dr

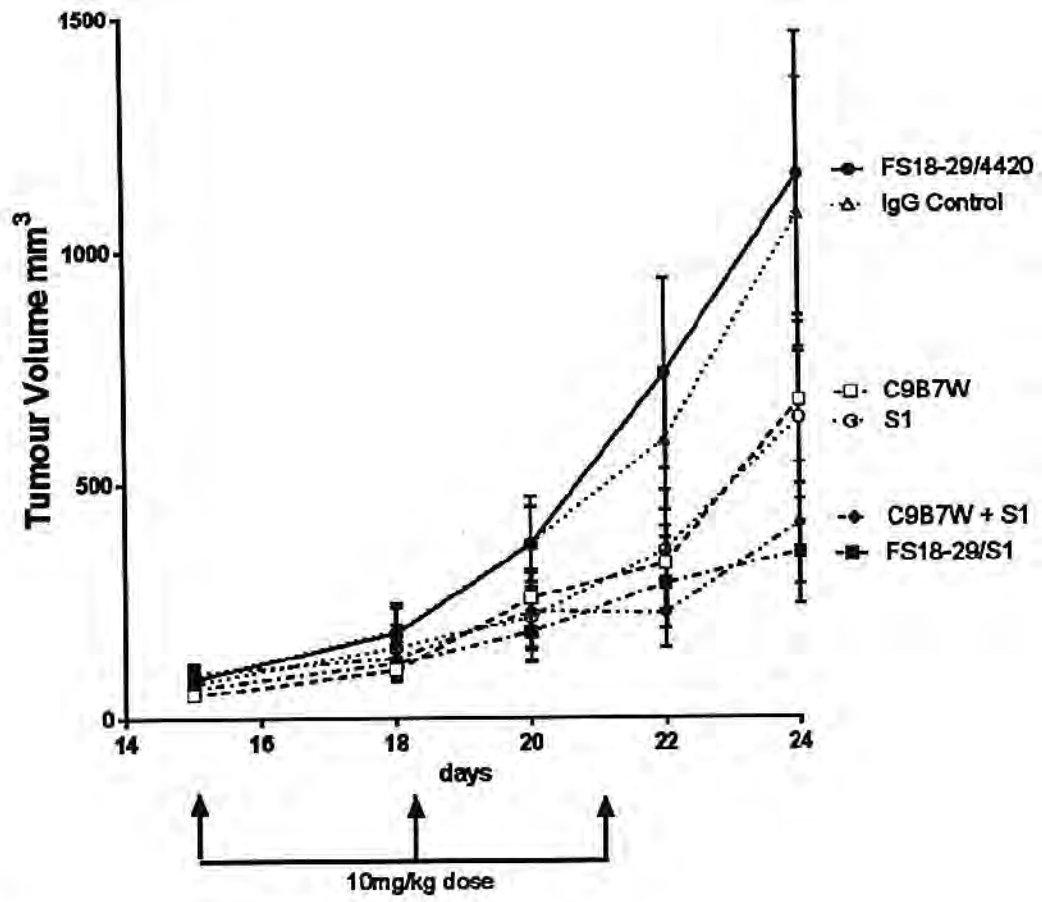


Figure 8

ae

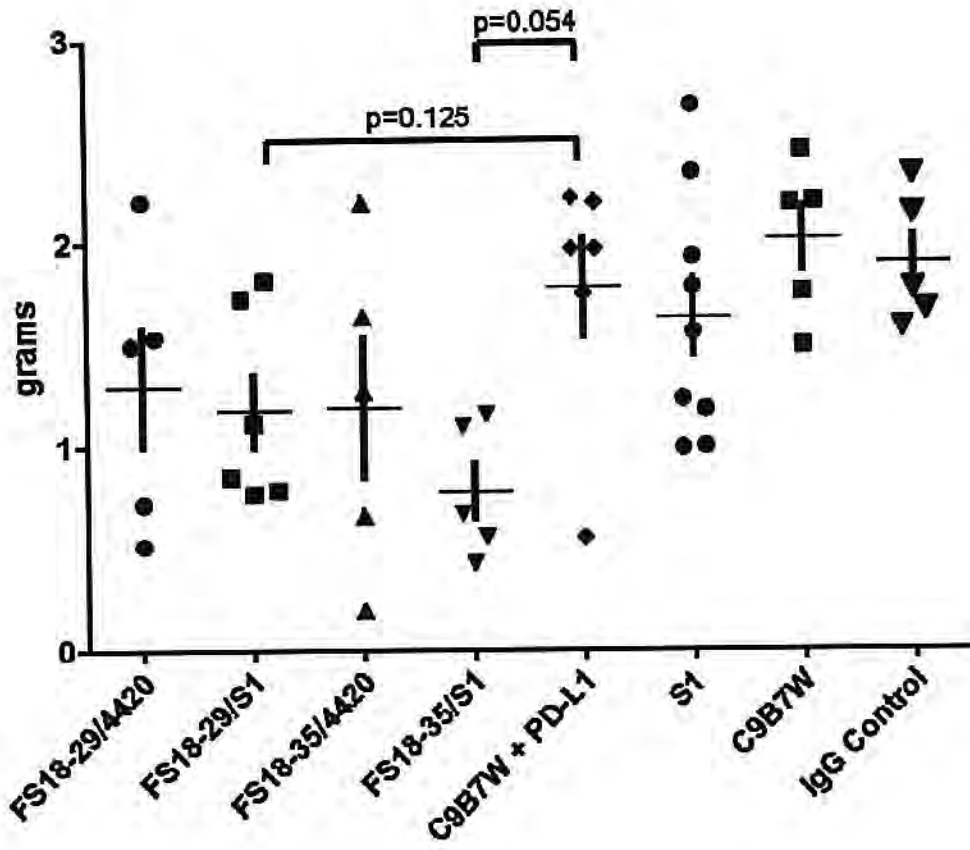


Figure 9

a

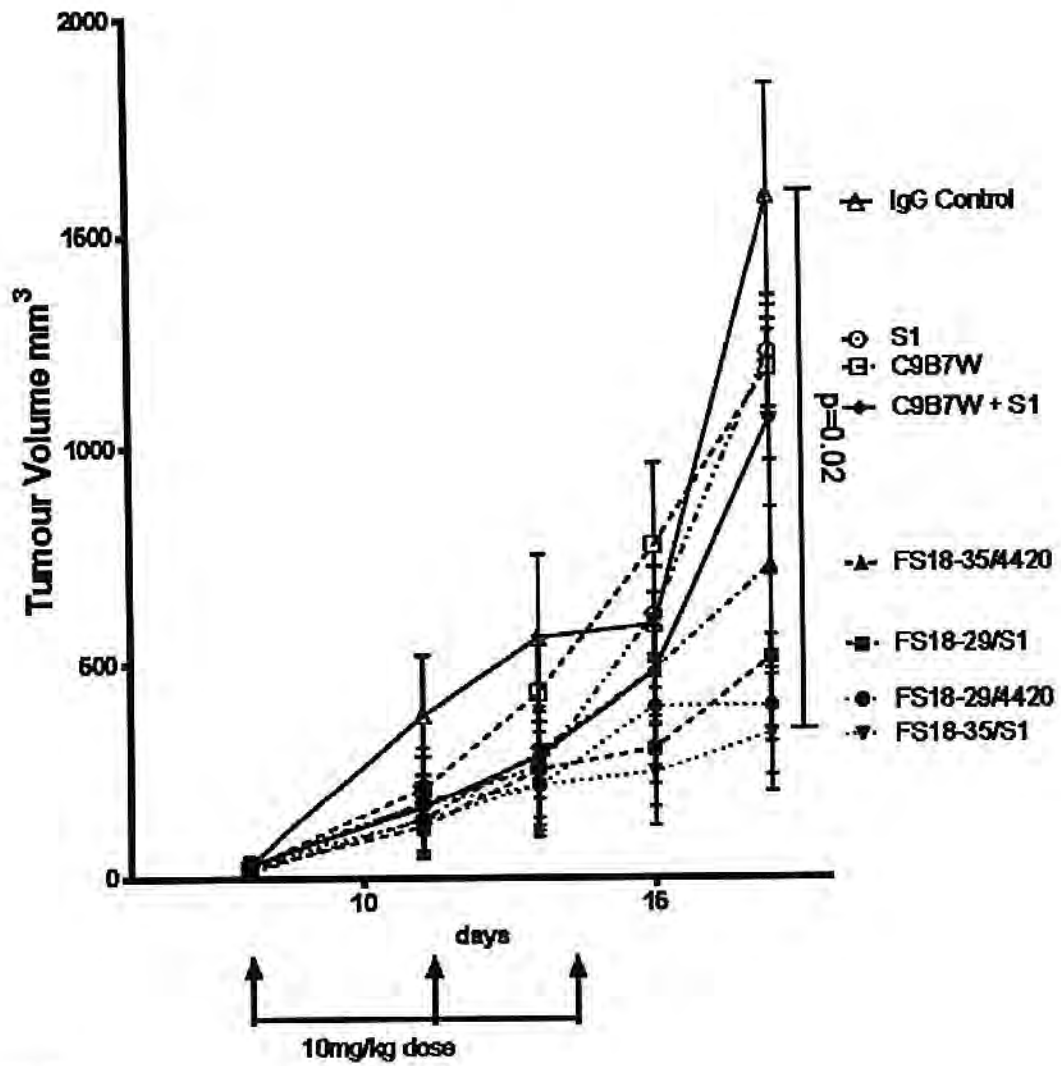


Figure 10

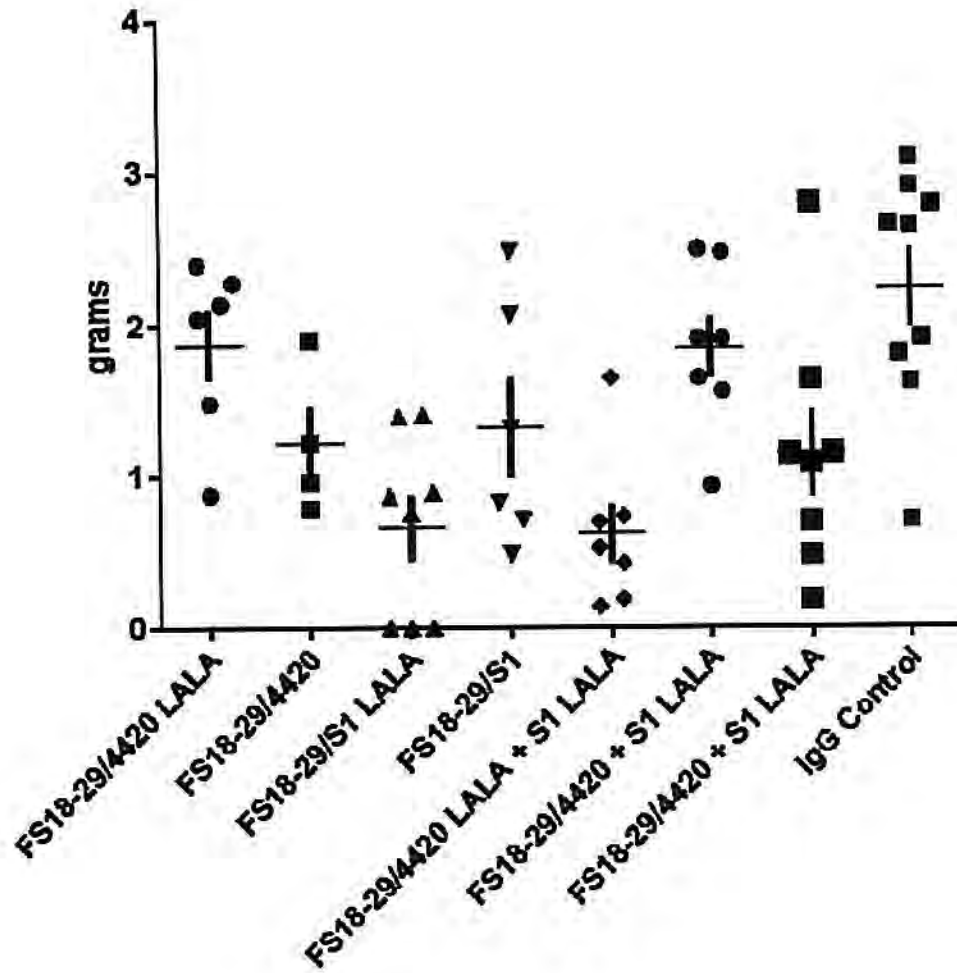


Figure 11

Handwritten signature

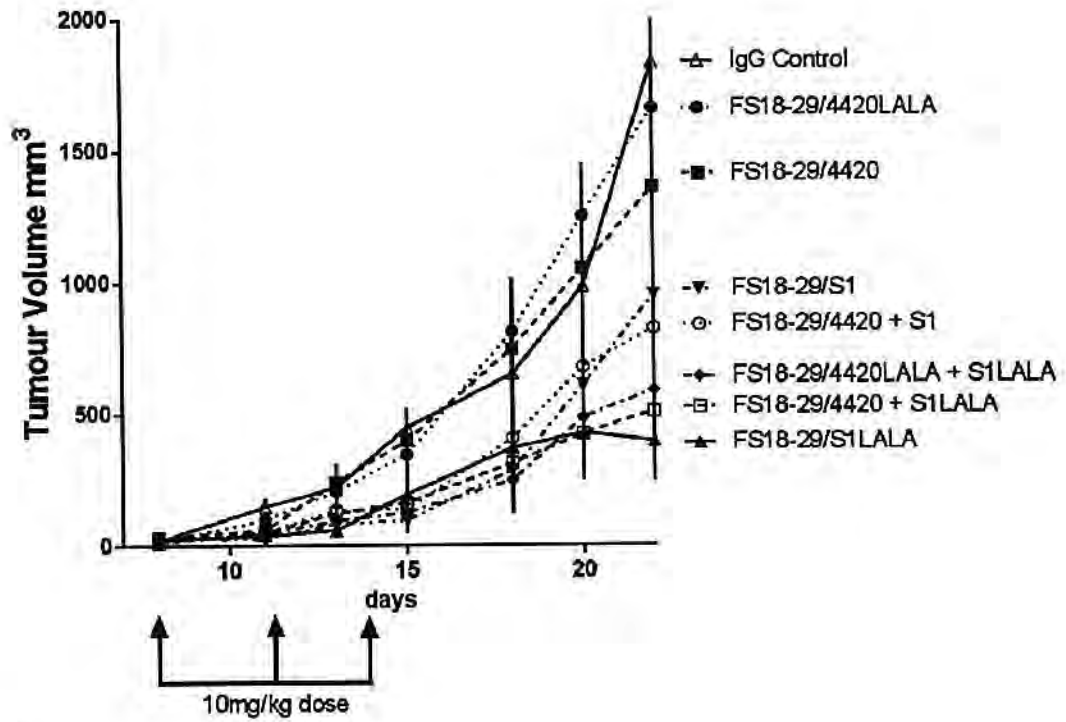


Figure 12

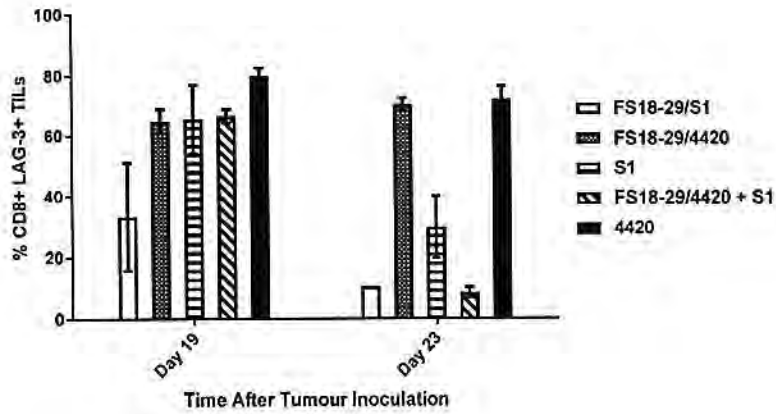
aw

WO 2017/220569

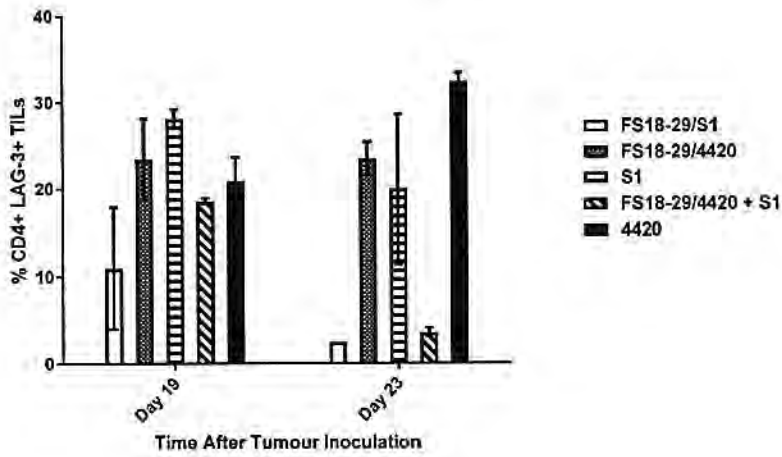
15/18

PCT/EP2017/065073

A



B



C

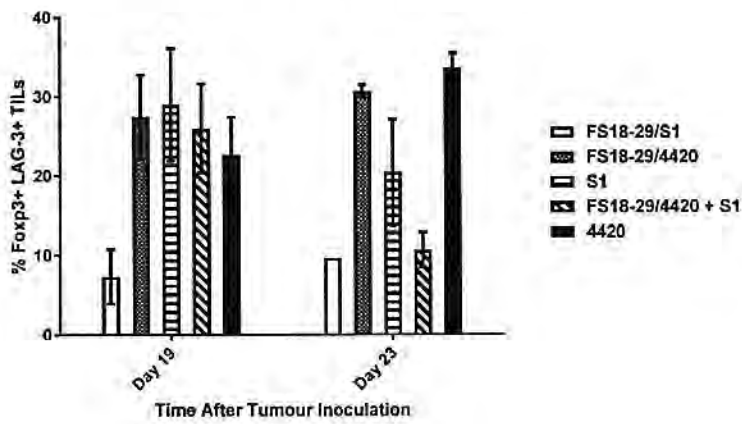


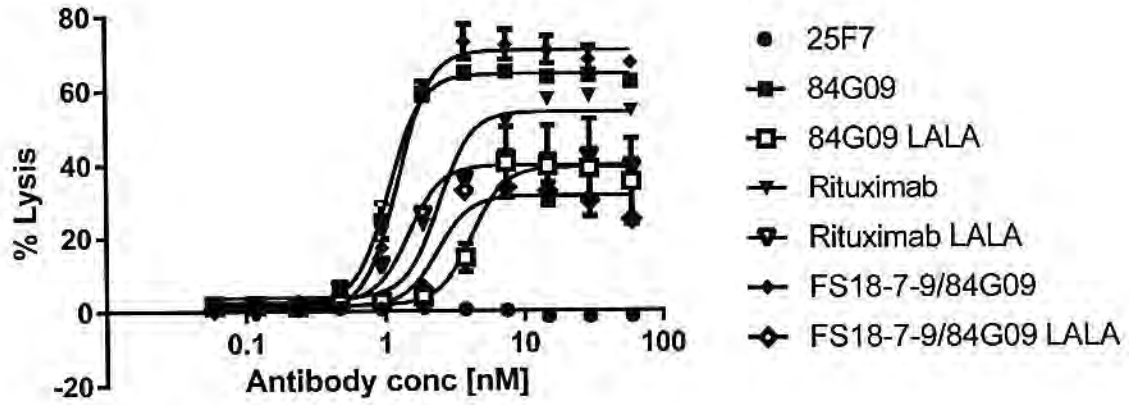
Figure 13

WO 2017/220569

PCT/EP2017/065073

16/18

A



B

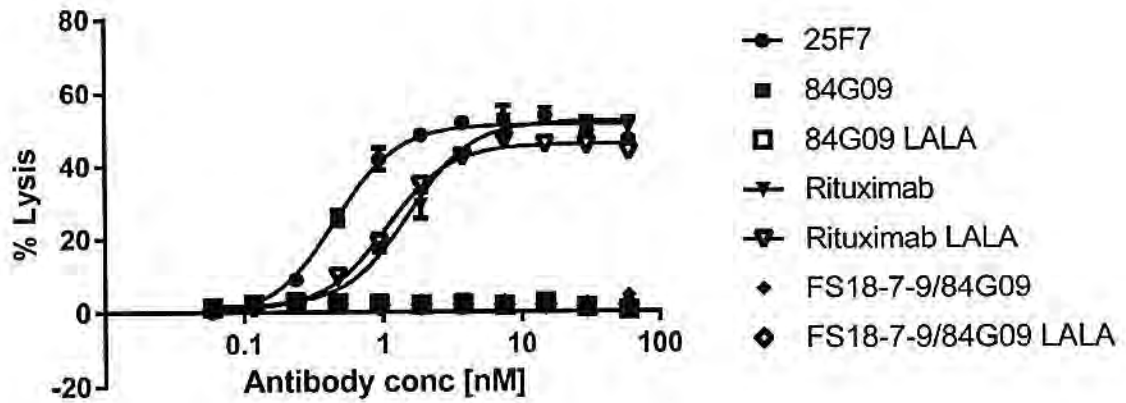


Figure 14

Handwritten signature

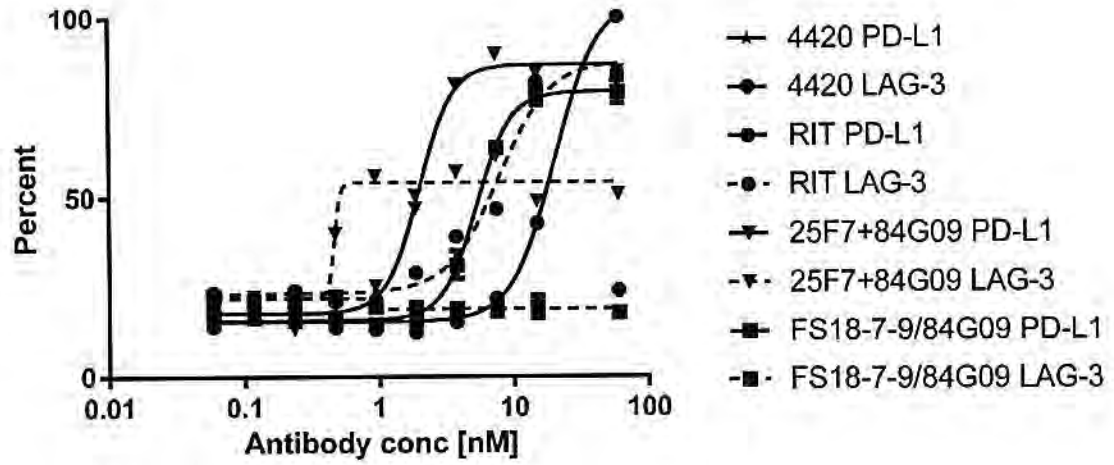
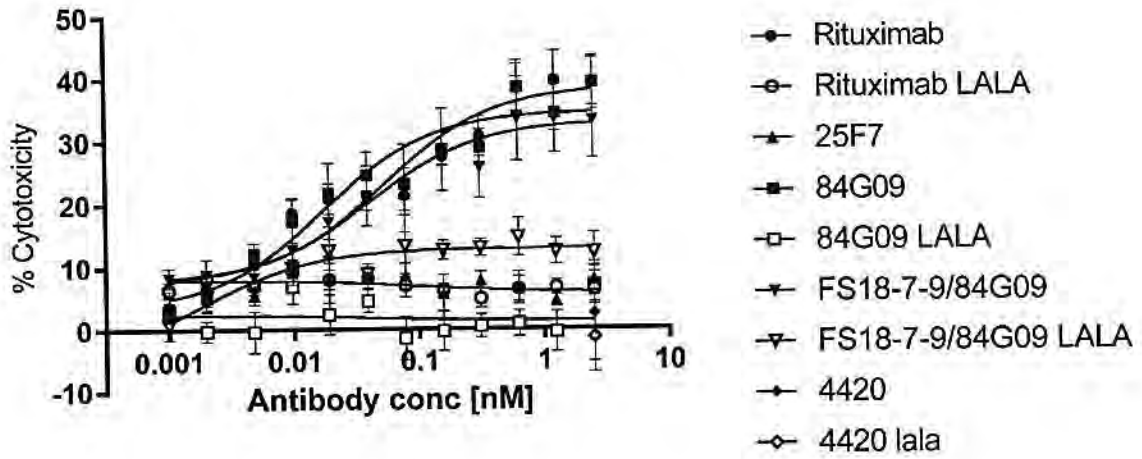


Figure 15

A



B

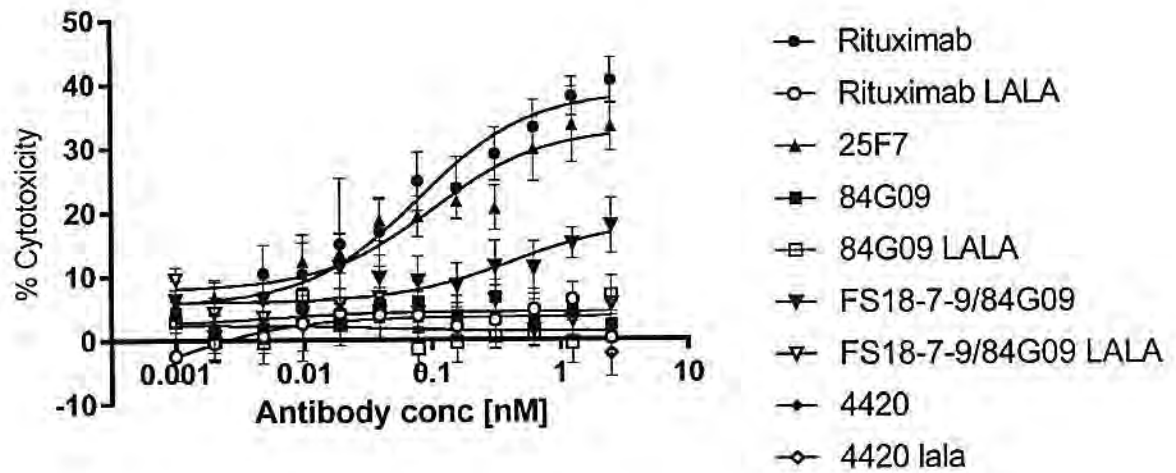


Figure 16

Handwritten signature