

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 924 071**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2016 PCT/IL2016/050952**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17037707**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2016 E 16775866 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3344658**

(54) Título: **Anticuerpos específicos para inmunoglobulina de células T humanas y dominio ITIM (TIGIT)**

(30) Prioridad:

02.09.2015 US 201562213140 P
29.03.2016 US 201662314427 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2022

(73) Titular/es:

YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. (50.0%)
Hi Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram, P.O. Box 39135 91390 Jerusalem, IL y
UNIVERSITY OF RIJEKA FACULTY OF MEDICINE (50.0%)

(72) Inventor/es:

MANDELBOIM, OFER;
KAYNAN, NOA S.;
TSUKERMAN, PINCHAS y
JONJIC, STIPAN

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 924 071 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos para inmunoglobulina de células T humanas y dominio ITIM (TIGIT)

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención pertenece al campo de la inmunoterapia y se refiere a anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos que se unen a la proteína TIGIT humana, a secuencias de polinucleótidos que codifican estos anticuerpos y a células de hibridoma que producen estos anticuerpos. La invención se relaciona además con composiciones terapéuticas que comprenden estos anticuerpos que pueden ser útiles en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, particularmente el cáncer, utilizando estos anticuerpos monoclonales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 **[0002]** La inmunoterapia contra el cáncer se utiliza para generar y aumentar una respuesta inmunitaria antitumoral, por ejemplo, mediante el tratamiento con anticuerpos específicos para抗igenos en células tumorales, con células cancerosas fusionadas con células presentadoras de抗igenos (APC), o mediante activación de células T antitumorales.

20 **[0003]** Las células asesinas naturales (NK) del sistema inmunitario innato juegan un papel importante en la vigilancia inmunitaria de los tumores (Smyth et al., Nat Immunol. 2001. Apr;2(4):293-9). Las células NK matan directa e indirectamente células, tumores, virus, parásitos y bacterias deficientes en MHC de clase I. La actividad de las células NK está controlada por un equilibrio de señales, proporcionadas por receptores de células NK inhibidores y activadores. Hay varios receptores activadores de células NK que reconocen varios ligandos, que pueden ser inducidos por estrés, automoléculas, componentes virales o proteínas tumorales (Koch et al., Trends in immunology 2013, 34, 182-191.; Seidel et al., Cellular and molecular life sciences, 2012). Sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales las células NK reconocen y eliminan tumores a través de la activación de receptores no se comprenden bien, en parte, porque se desconocen los ligandos tumorales de varios receptores de células NK activadores. Por el contrario, la identidad de los ligandos reconocidos por los receptores inhibidores de células NK está bien definida. Las células NK expresan un amplio repertorio de receptores inhibitorios (Gardiner CM, International journal of immunogenetics 2008, 35, 1-8.; Gonen-Gross et al., PloS one 2010, 5, e8941; Lankry et al., Methods in molecular biology 2010, 612, 249-273). La mayoría de estos receptores inhibitorios pertenecen a la familia KIR (Killer Inhibitory Receptors), que reconocen proteínas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clásico y no clásico. Los KIR se expresan estocásticamente en la superficie de las células NK, por lo que las células NK en un individuo dado expresan KIR seleccionados. Las células NK también expresan receptores inhibitorios adicionales que no reconocen las proteínas MHC de clase I, como CEACAM1, CD300a y TIGIT (Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM).

35 **[0004]** La proteína TIGIT humana se expresa en todas las células NK, así como en otras células inmunitarias como las células T reguladoras (Treg) CD8+ y los linfocitos infiltrantes de tumores (Stanietsky et al., PNAS. 2009, 106, 17858-17863). Reconoce dos ligandos muy bien definidos: el receptor del poliovirus (PVR, CD155) y Nectin2 (PVRL2/CD112) que se expresan en epitelios normales y se sobreexpresan en varias células tumorales. El reconocimiento de estos ligandos conduce a la entrega de una señal inhibidora mediada por dos motivos presentes en la cola citoplasmática de TIGIT: los motivos inmunorreceptores similares a la tirosina de la cola (ITT) y los motivos inhibidores basados en la tirosina inmunodominante (ITIM) (Liu et al., Cell death and differentiation 2013., 20, 456-464, Stanietsky et al., European journal of immunology, 2013. 43, 2138-2150). TIGIT, a través de su dominio ITIM, inhibe la citotoxicidad de NK que conduce al mecanismo de evasión inmune de las células tumorales.

40 **[0005]** La expresión de TIGIT en las células NK también sirve como receptor que se une a la proteína Fap2 de la bacteria anaerobia gramnegativa *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*). La interacción entre *F. nucleatum* y TIGIT conduce a una actividad citotóxica reducida de NK. Las fusobacterias a menudo se enriquecen en pacientes con inflamación intestinal y cáncer. Se sugirió que la unión de *F. nucleatum* a TIGIT facilita la evasión tumoral de la citotoxicidad asociada a NK (Gur et al., Immunity. 2015 February 17; 42(2): 344-355), proporcionando una explicación sobre cómo las bacterias que se encuentran dentro de los tumores, en particular, *F. nucleatum*, promover la proliferación tumoral y potenciar la progresión tumoral (Jobin, Cancer discovery. 2013; 3:384-387; Sears and Garrett, Cell Host Microbe. 2014; 15:317-328).

45 **[0006]** Recientemente, se demostró que TIGIT y PD-1 alteran las células T CD8+ específicas del抗igeno tumoral en pacientes con melanoma (Chauvin et al. J Clin Invest. 2015; 125 (5): 2046-2058). Además, se ha informado la expresión de TIGIT por linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) CD8+ mediante análisis de expresión génica en varios tumores sólidos humanos y de ratón, incluidos los cánceres de pulmón, colon, mama, útero y riñón. La expresión elevada de TIGIT parece correlacionarse con la expresión de CD8 y PD-1. Se observó expresión de TIGIT en TIL CD8+ en tumores de ratón y en 3 muestras de tumores humanos, incluidos cánceres de colon y de pulmón de células no pequeñas (Johnston RJ, et al. Cancer Cell. 2014;26(6):923-937).

55 **[0007]** Se sugirió que TIGIT contribuye al deterioro funcional de las células T y se asocia con un mal resultado clínico en la leucemia mieloide aguda (LMA). Un estudio publicado recientemente por Kong et al. (Clin Cancer Res; 22(12); 3057-66), sugiere que el bloqueo de TIGIT para restaurar la función de las células T y la inmunidad antitumoral puede representar una nueva terapia eficaz contra la leucemia.

- [0008] El documento WO 2004/024068 describe agonistas y antagonistas de la molécula PRO52254, posteriormente identificada como TIGIT, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y cáncer sin revelar anticuerpos reales.

5 [0009] El documento WO 2006/124667 describe la modulación de la proteína zB7R1 (TIGIT) mediante anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de TIGIT a su ligando PVR. No se proporcionan afinidades de unión.

10 [0010] El documento WO 2009/126688 describe TIGIT y su ligando PVR como dianas para la modulación de las respuestas inmunitarias y sugiere agonistas y antagonistas de estas proteínas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmunitario.

[0011] El documento WO 2015/009856 describe combinaciones de antagonistas del polipéptido de muerte programada 1 (PD-1) y anticuerpos anti TIGIT para el tratamiento del cáncer y la infección crónica.

15 [0012] El documento WO 2016/028656 divulga anticuerpos anti-TIGIT, así como el uso de estos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y las enfermedades infecciosas.

20 [0013] CN103073644 A describe un TIGIT anti-ratón (Ig de células T y dominio ITIM), y una cepa de células de hibridoma mTIGITmAb-13G6 para producir el anticuerpo monoclonal, y además se relaciona con un método de preparación y aplicación del anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal puede prevenir eficazmente la combinación de mTIGIT y mPVR (receptor de poliovirus) y puede usarse para Western blot, ELISA y citometría de flujo para la detección de moléculas de mTIGIT.

25 [0014] Existe una necesidad insatisfecha de proporcionar agentes adicionales y más efectivos, específicos, seguros y/o estables que, solos o en combinación con otros agentes, permitan que las células del sistema inmunitario ataquen las células tumorales al inhibir la actividad supresora de la TIGIT humana.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 30 [0015] La presente divulgación describe agentes que reconocen el receptor inhibidor de células inmunitarias "inmunoglobulina de células T y dominio ITIM" (TIGIT) e inhiben su actividad supresora en linfocitos tales como células asesinas naturales (NK) y células T. Estos agentes son anticuerpos y fragmentos de los mismos, caracterizados por tener conjuntos únicos de secuencias CDR, afinidad excepcionalmente alta y alta especificidad por TIGIT humana y son útiles en la inmunoterapia del cáncer para combatir la evasión inmune tumoral, como terapia independiente y en combinación con otros anticuerpos anti TIGIT y/u otros agentes anticancerígenos.

35 [0016] Los anticuerpos monoclonales (mAb) descritos en el presente documento muestran una especificidad absoluta por la TIGIT humana, en comparación con la TIGIT de ratón, por ejemplo, y una afinidad por la proteína TIGIT humana, que es mayor que la afinidad del ligando natural, PVR (CD155) por TIGIT humano. Esto hace que estos mAbs superiores sean candidatos valiosos para su uso en la inmunoterapia contra el cáncer, lo que permite la administración de dosis más bajas con menos efectos secundarios.

40 [0017] Los anticuerpos monoclonales descritos en este documento son capaces no solo de interferir con la unión de TIGIT humana a su ligando principal PVR (CD155) sino también de inhibir, al menos hasta cierto punto, la unión de TIGIT a al menos uno de sus otros ligandos, tales como CD112 y CD113.

45 [0018] Los anticuerpos monoclonales anti-TIGIT descritos en el presente documento tienen un efecto sinérgico cuando se combinan con agentes anticancerígenos adicionales, como otras proteínas inmunomoduladoras o inhibidores de receptores. Los ejemplos no limitantes son los mAb específicos de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, también conocida como CD152) y los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

50 [0019] La presente invención proporciona, según un aspecto, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo del fragmento se une a la inmunoglobulina de células T humanas y al dominio ITIM (TIGIT) y es capaz de inhibir la unión de TIGIT a al menos PVR (CD155), en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende

55

- (i) una cadena pesada que comprende un HCDR1 como se establece en SEQ ID NO: 1 u 11; HCDR2 como se establece en SEQ ID NO: 2; HCDR3 como se establece en SEQ ID NO: 3; y
- (ii) una cadena ligera que comprende un LCDR1 como se establece en SEQ ID NO: 4; LCDR2 como se establece en SEQ ID NO: 5; y LCDR3 como se establece en SEQ ID NO: 6.

[0020] Según una forma de realización específica, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia: QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEYPRSGNTY YNEFKFGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVENTFCARKGPYYTKNEDYWGQGTILT VSS (SEQ ID NO: 7) y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia:

DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASEHIYYSLAWYQQKQGKSPQLIYNANSLED
GVPSRFSGSQGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDVPRTFGGGTKLEIKRADAAPTV

5

S (SEQ ID NO:8).

- [0021] Según la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de reconocer la proteína TIGIT expresada en células T.
- [0022] Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de reconocer la proteína TIGIT humana expresada en células dendríticas o NK.
- [0023] De acuerdo con algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de reconocer la proteína TIGIT humana expresada en células T reguladoras (Treg).
- [0024] Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de reconocer la proteína TIGIT humana expresada en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) CD8+.
- [0025] Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir la unión de TIGIT humana a un ligando expresado en células T.
- [0026] Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir la unión de TIGIT humana al ligando expresado en células dendríticas o NK.
- [0027] Según aún otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir la unión de TIGIT humana al ligando expresado en células tumorales.
- [0028] El anticuerpo aislado o fragmento del mismo puede unirse a la proteína TIGIT humana con una constante de disociación (K_d) de al menos aproximadamente 50 nM. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo puede unirse a la proteína TIGIT humana con una afinidad de unión de al menos 1 nM. Por lo tanto, el anticuerpo o el anticuerpo pueden tener una afinidad por la TIGIT humana de al menos aproximadamente 5×10^{-8} M. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse con una afinidad de 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M o incluso superior al TIGIT humano. El mAb se puede seleccionar del grupo que consiste en: anticuerpo no humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo químico, anticuerpo biespecífico y un fragmento de anticuerpo que comprende al menos la porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Según la invención, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo formado por: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fd', Fv, dAb, anticuerpo monocatenario (scab) y "diacuerpos".
- [0029] Según algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo biespecífico, capaz de unirse a dos epítopos o antígenos diferentes.
- [0030] Un mAb biespecífico o un fragmento de mAb biespecífico puede comprender dos regiones hipervariables (HVR) diferentes, cada una de las cuales comprende un conjunto diferente de secuencias de CDR.
- [0031] El mAb o fragmento biespecífico puede comprender los dominios de unión de dos anticuerpos anti-TIGIT diferentes. Cada HVR de un mAb o fragmento biespecífico según estas realizaciones es capaz de unirse a un epítopo diferente de la proteína TIGIT humana.
- [0032] Una HVR de un mAb biespecífico o fragmento del mismo puede comprender las CDR: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; y el segundo HVR comprende las CDR: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.
- [0033] Una HVR de un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo biespecífico puede unirse a TIGIT humana y la segunda HVR puede unirse a otra proteína, como una proteína implicada en la regulación inmunitaria o un antígeno tumoral. La segunda HVR del anticuerpo biespecífico puede unirse a una molécula de punto de control.
- [0034] El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia marco seleccionada del grupo que consiste en: IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, IgG3 de ratón, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana.
- [0035] Según otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo humanizado.
- [0036] El anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia marco seleccionada del grupo que consiste en: IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana.
- [0037] Según aún otras formas de realización, se describe un conjugado de anticuerpo que comprende al menos un

anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce TIGIT e inhibe la unión a su ligando, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR): (i) CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia que comprende: GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 1) o TSYGIS (SEQ ID NO: 11), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 2) y CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: KGPYYTKNEDY (SEQ ID NO: 2) NO:3) y cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASEHIYYSLA (SEQ ID NO: 4), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: NANSLED (SEQ ID NO: 5) y cadena ligera CDR3 que tiene la secuencia: KQAYDVPRT (SEQ ID NO: 6).

5 [0038] El conjugado puede comprender una proteína transportadora.

10 [0039] De acuerdo con algunas formas de realización, las secuencias de polinucleótidos que codifican anticuerpos monoclonales, que tienen alta afinidad y especificidad por TIGIT, así como los vectores que llevan estas secuencias de polinucleótidos, se proporcionan de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, donde la secuencia de polinucleótidos codifica un anticuerpo capaz de unión a un epítopo dentro de la proteína TIGIT humana, que comprende: las seis secuencias de CDR: (i) secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada de: GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 1) o TSYGIS (SEQ ID NO: 11), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 2), cadena pesada CDR3 que tiene la secuencia: KGPYYTKNEDY (SEQ ID NO: 3), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASEHIYYSLA (SEQ ID NO: 4), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: NANSLED (SEQ ID NO: 5), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: KQAYDVPRT (SEQ ID NO: 6), en el que la secuencia de polinucleótidos comprende las secuencias establecidas en SEQ ID NO: 9:

15 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCCTGGGCTTCAGTGAA
GCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTCACAGCTATGGTATAAGCTGGTGAAG
GCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTCTCCAGAACAGTGGTA
20 ATACTTACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCC
25 TCCAGCACAGCGTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
TTCTGTGCAAGAAAGGGACCCTACTATACTAAAGAACGAGGACTACTGGGCCAAGG
CACCATTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 9), y SEQ ID NO: 10:

30 GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGTGGAGAAACTGTC
ACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGCACATTACTACAGTTAGCATGGTATCAGCAG
AAGCAAGGAAATCTCCTCAGCTCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGAAGATGG
35 TGTCCCCTGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACACAATATTCTATGAAGATCAA
CAGCATGCAGCCTGAAGATACCGCAACTTATTCTGTAAACAGGCTATGACGTTCC
TCGGACCTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGG
40 CTGATGCTGCACCAACTGTATCC (SEQ ID NO:10).

50 [0040] En todavía otro aspecto la presente invención proporciona una célula de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal que comprende las seis secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR): (i) secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada de GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 1) o TSYGIS (SEQ ID NO: 11), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 2), cadena pesada CDR3 que tiene la secuencia: KGPYYTKNEDY (SEQ ID NO: 3), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASEHIYYSLA (SEQ ID NO: 4), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia : NANSLED (SEQ ID NO: 5), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: KQAYDVPRT (SEQ ID NO: 6).

55 [0041] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la presente invención se pueden unir a un resto citotóxico, un resto radiactivo o un resto identificable.

[0042] La presente invención proporciona, según otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo, al menos un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo como se describe anteriormente, que reconoce TIGIT con alta afinidad y especificidad e inhibe su interacción con uno de sus ligandos y al menos un excipiente, diluyente, sal o vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 [0043] También se describe un método que puede usarse para inhibir la unión de TIGIT humana a al menos un ligando usando un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo definido anteriormente.

[0044] La presente descripción también se refiere a métodos útiles para potenciar la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo definido anteriormente.

65 [0045] De acuerdo con una forma de realización específica, la presente invención proporciona además la composición farmacéutica como se describe anteriormente para usar en el tratamiento del cáncer.

- [0046]** El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en: pulmón, tiroides, mama, colon, melanoma, próstata, hígado, vejiga, renal, cervical, pancreático, leucemia, linfoma, mieloide, ovario, útero, sarcoma, biliar, cáncer de pulmón de células no pequeñas y de células endometriales.
- 5 **[0047]** El cáncer también se puede seleccionar del grupo que consiste en: melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón y colon de células no pequeñas y cáncer hepático (hígado). Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la invención.
- 10 **[0048]** El cáncer puede ser melanoma.
- [0049]** Según algunas formas de realización, el cáncer puede ser un cáncer sólido. El cáncer sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de melanoma (piel), pulmón, colon, mama, útero y riñón.
- 15 **[0050]** El cáncer puede ser leucemia. El cáncer puede ser leucemia mieloide aguda (LMA).
- [0051]** De acuerdo con algunas formas de realización específicas, el anticuerpo monoclonal en la composición farmacéutica administrada comprende: CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 1), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 2), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: KGPYTYTKNEDY (SEQ ID NO: 3), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: RASEHIYYSLA (SEQ ID NO: 4), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: NANSLED (SEQ ID NO: 5), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: KQAYDVPRT (SEQ ID NO: 6).
- 20 **[0052]** De acuerdo con otras formas de realización específicas, el anticuerpo en la composición farmacéutica administrada es biespecífico y comprende además: CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia IYCIH (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EISPSNGRTIYNEKFKN (SEQ ID NO: 13), cadena pesada CDR3 que tiene la secuencia: SDGYDGYYFDY (SEQ ID NO: 14), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASQEISGYLN (SEQ ID NO: 15), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: AASTLDS (SEQ ID NO: 16), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: LQYASYPRT (SEQ ID NO: 17).
- 25 **[0053]** Según la presente divulgación, el método para tratar el cáncer comprende administrar o realizar al menos una terapia anticancerígena adicional. La terapia contra el cáncer adicional puede ser cirugía, quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia.
- 30 **[0054]** El método de tratamiento del cáncer puede comprender la administración de un anticuerpo monoclonal que reconoce la TIGIT humana con alta afinidad y especificidad y un agente anticancerígeno adicional. El agente anticancerígeno adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en: inmunomodulador, célula de linfocito activada, inhibidor de cinasa y agente quimioterapéutico.
- 35 **[0055]** De acuerdo con algunas formas de realización, el modulador inmunitario adicional es un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario seleccionada del grupo que consiste en proteína 1 de muerte celular programada humana (PD-1), PD-L1 y PD-L2, molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembionario 1 (CEACAM1), gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), CD137, OX40 (también denominado CD134), receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR) y cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la invención.
- 40 **[0056]** El método de tratamiento del cáncer puede comprender la administración de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal que reconoce TIGIT humana según la invención y un anticuerpo anti-PD-1.
- 45 **[0057]** El método de tratamiento del cáncer puede comprender la administración de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal que reconoce TIGIT humana según la invención y un anticuerpo anti-CTLA-4.
- 50 **[0058]** El método para tratar el cáncer puede comprender la administración de la composición farmacéutica como parte de un régimen de tratamiento que comprende la administración de al menos un agente anticanceroso adicional.
- 55 **[0059]** El agente anticanceroso puede seleccionarse del grupo que consiste en: Erbitux, citarabina, fludarabina, fluorouracilo, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, gemcitabina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, carmustina, lomustina, clorambucilo, ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, ifosamida, mecloretamina, melfalán, tiotepa, dacarbazine, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etopósido, tenipósido y combinaciones de los mismos. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la invención.
- 60 **[0060]** Según algunas formas de realización, el agente anticanceroso es un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El inhibidor de EGFR se puede seleccionar del grupo que consiste en: Cetuximab (Erbitux®), Panitumumab (Vectibix®) y necitumumab (Portrazza®). Según algunas formas de realización, el inhibidor de EGFR es Cetuximab (Erbitux®).

5 [0061] La presente invención comprende además, según otro aspecto, un método para determinar o cuantificar la expresión de TIGIT, comprendiendo el método poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y medir el nivel de formación de complejos, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en: (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 1), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 2), cadena pesada CDR3 que tiene la secuencia: KGPYYTKNEDYV (SEQ ID NO: 3), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASEHIYSLA (SEQ ID NO: 4), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: NANSLED (SEQ ID NO: 5), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: KQAYDVPRT (SEQ ID NO: 6); y (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia IYCIH (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EISPSNGRTIYNEKFKN (SEQ ID NO: 13), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: SDGYDGYYFDY (SEQ ID NO: 14), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASQEISGYLN (SEQ ID NO: 15), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: AASTLDS (SEQ ID NO: 16) y cadena ligera CDR3 que tiene la secuencia: LQYASYPRT (SEQ ID NO: 17).

10 15 [0062] Los métodos de determinación y cuantificación se pueden realizar *in vitro* o *ex vivo* o se pueden usar en el diagnóstico de condiciones asociadas con la expresión de TIGIT. Los anticuerpos según la presente invención también se pueden usar para configurar métodos de exploración. Por ejemplo, se puede construir un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA) para medir los niveles de polipéptido secretado o asociado a células usando los anticuerpos y métodos conocidos en la técnica.

20 [0063] El método para detectar o cuantificar la presencia de TIGIT puede comprender los pasos de:

- 25 i. incubar una muestra con un anticuerpo específico de TIGIT o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos una porción de unión a antígeno;
ii. detectar el TIGIT unido usando una sonda detectable.

[0064] De acuerdo con algunas formas de realización, el método puede comprender además los pasos de:

- 30 iii. comparar la cantidad de (ii) con una curva estándar obtenida de una muestra de referencia que contiene una cantidad conocida de TIGIT; y
iv. calcular la cantidad de TIGIT en la muestra a partir de la curva estándar. Según algunas formas de realización particulares la muestra puede ser un fluido corporal.

35 [0065] El método se puede realizar *in vitro* o *ex vivo*.

40 [0066] También se proporciona un kit para medir la expresión de TIGIT en muestra biológica que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que consta de: (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 1), cadena pesada CDR2 que tiene la secuencia: EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 2), cadena pesada CDR3 que tiene la secuencia: KGPYYTKNEDY (SEQ ID NO: 3), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASEHIYSLA (SEQ ID NO: 4), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: NANSLED (SEQ ID NO: 5), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: KQAYDVPRT (SEQ ID NO: 6); y (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia IYCIH (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EISPSNGRTIYNEKFKN (SEQ ID NO: 13), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: SDGYDGYYFDY (SEQ ID NO: 14), cadena ligera CDR1 que tiene la secuencia: RASQEISGYLN (SEQ ID NO: 15), cadena ligera CDR2 que tiene la secuencia: AASTLDS (SEQ ID NO: 16) y cadena ligera CDR3 que tiene la secuencia: LQYASYPRT (SEQ ID NO: 17).

45 50 [0067] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o conjugados de los mismos, de acuerdo con la presente descripción, pueden usarse en cualquier método de diagnóstico, terapéutico o profiláctico que utilice la unión a la proteína TIGIT humana, siempre que sean capaces de unirse específicamente a dicha proteína e inhibir su unión a al menos un ligando.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 [0068]

Figuras 1A-1C. Expresión de TIGIT en células inmunitarias efectoras.

60 Figura 1A. Gráfica de histograma FACS de 2×10^5 células YTS (izquierda) o células YTS que sobreexpresan TIGIT (derecha). Las curvas rellenas de gris a la izquierda representan la tinción con IgG de ratón de control (mlgG). Las curvas vacías de la derecha representan la tinción con dos mAb TIGIT antihumanos como se indica (VSIG9#1 y 258-CS1#4).

65 Figura 1B. Histogramas FACS de la expresión de TIGIT en células NK de dos donantes sanos (I y II como se indica). Las curvas rellenas de gris a la izquierda representan la tinción con control mlgG. La curva vacía de la derecha representa la tinción con anti TIGIT (clon VSIG9#1).

Figura 1C. Histogramas FACS de la expresión de TIGIT en células TIL CD8+ de dos pacientes con

melanoma (TIL-I y TIL-II). La curva gris izquierda representa la tinción con control mIgG. La curva vacía de la derecha representa la tinción con anti TIGIT (clon VSIG9#1).

Figuras 2A-2B. Inhibición de la unión de TIGIT por mAb VSIG9#1:

5

Figura 2A. Gráfico de histograma FACS de células HepG2 (que expresan altos niveles de PVR, Nectin-2 y Nectin-3) que se incubaron con hTIGIT-Fc (1), hTIGIT-Fc con control mIgG (2) o hTIGIT-Fc con anti-TIGIT mAb VSIG9#1 a las concentraciones indicadas (3 y 4).

10

Figura 2B. Gráfica de histograma FACS de ligandos TIGIT (histogramas vacíos) expresados por células HepG2 indicadas en las gráficas individuales. Los histogramas llenos de gris representan la tinción solo con mIgG de control.

Figuras 3A-3D. El bloqueo de TIGIT conduce a una mayor actividad letal.

15

Figura 3A. Se midió la actividad de destrucción específica para células 721.221-PVR marcadas con ^{35}S que se incubaron con células YTS-TIGIT (en una proporción de 1:10) y con control mIgG (barra izquierda) o anti TIGIT-VSIG9#1 (barra derecha). * p < 0,005.

20

Figura 3B. Se midió la actividad de destrucción específica para células de cáncer de mama MDA-MB-231 marcadas con ^{35}S que se incubaron con células NK de un donante sano (en una proporción de 1:10) y con control mIgG (barra izquierda) o anti TIGIT mAb VSIG9#1 (barra derecha). ** p < 0,002.

25

Figura 3C. Se midió la actividad de destrucción específica para células Mel 562 marcadas con ^{35}S que se incubaron con células NK de un donante sano (en una proporción de 1:10) y con control mIgG (barra derecha), anti-TIGIT VSIG9#1 (barra izquierda), o con anti TIGIT 258-CS1#4 (barra central). ** p < 0,05.

30

Figura 3D. Se midió la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) para células HepG2 marcadas con ^{35}S que se incubaron con mAb anti-EGFR (Erbitux®) y se agregaron a células NK preincubadas con mAb de control (barra izquierda) o con anti-EGFR. VSIG9#1 (barra derecha) (a una proporción de 10:1, efectores: células diana, respectivamente). ** p < 0,0007.

35

Figuras 4A-4B. Los anticuerpos 258-CS1#4 y VSIG9#1 bloquean la unión de TIGIT a PVR. Las células HepG2 que expresan el ligando PVR de TIGIT se incubaron con TIGIT-Fc o TIGIT-Fc después de la preincubación con mAb VSIG9#1 (Figura 4A), o con mAb 258-CS1#4 (Figura 4B) y la unión se midió usando FACS.

40

Figuras 5A-5B. Análisis cinéticos de unión de los mAbs 258-CS1#4 (#4) (Figura 5A) y VSIG9#1 (Figura 5B) al biosensor cargado con TIGIT humano de dos fuentes comerciales, utilizando Biacore.

45

Figuras 6A-6B. El anticuerpo VSIG9#1 se une a las células TIGIT significativamente más fuerte que el anticuerpo comercial MBSA43 (eBioscience Cat# 12-9500-42).

50

Figura 6A. Gráficos de histograma FACS de VSIG9#1 y el anticuerpo comercial MBSA43 que se une a TIGIT. Las células YTSTIGIT (75×10^3) se tiñeron con anticuerpos anti-TIGIT VSIG9#1 (histograma abierto negro) o MBSA43 (histograma abierto gris) en un rango de concentración de 250 nM a 65 fM en diluciones en serie. Fondo: tinción de mIgG (histogramas llenos de gris). Cada panel representa una concentración específica de los anticuerpos como se indica. El eje Y de cada panel son los recuentos de células y el eje X es la intensidad de fluorescencia (FL1-H).

Figura 6B. Análisis gráfico de la unión descrita en la Figura 6A. La mitad de la intensidad máxima se logra en los puntos indicados (MBSA43 gris punteado, mAb VSIG9#1 negro punteado).

55

Figuras 7A y 7B. El anticuerpo VSIG#9 es significativamente más potente en la prevención de interacciones PVR-TIGIT que el anticuerpo comercial MBSA43 según lo medido por análisis FACS.

60

Figura 7A. Gráficos de histograma de tinción de células YTSTIGIT. 75×10^3 células YTSTIGIT se incubaron con 2,5 pmol de PVR-Fc (histogramas grises abiertos) en presencia de VSIG9#1 (histogramas negros abiertos) o MBSA43 (histogramas grises discontinuos) en un rango de concentraciones de anticuerpos de 27 a 0,014 pmol en una serie de diluciones dobles. El PVR unido se detectó mediante IgG antihumana de ratón anti Alexa Fluor® 488 (BioLegend).

65

Figura 7B. Gráficos de histograma de tinción de células YTSTIGIT. Se incubaron 75×10^3 células YTSTIGIT con 2,5 pmoles de PVR-Fc en presencia de VSIG9#1 (histogramas negros abiertos) o MBSA43 (histogramas grises discontinuos) en un rango de concentraciones de 27 a 0,014 pmoles en una serie de dos diluciones de pliegues. El anti TIGIT unido fue detectado por Alexa Fluor® 647 cabra anti-ratón IgG (BioLegend).

70

Cada panel en las Figuras 7A y 7B representa una concentración específica de los anticuerpos como se indica. El eje Y de cada panel son los recuentos de células y el eje X es la intensidad de fluorescencia (FL1-H/FL-4). Los números en el panel indican la Intensidad Fluorescente Media (MFI).

75

Figura 8: El bloqueo de TIGIT por mAb VSIG9#1 (Vsig9.01) induce la proliferación de células T solo o en combinación con anti-PD-1 y anti-CTLA4. Las PBMC de donantes sanos se marcaron con 5(6)-carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimidil éster (CFSE) y se activaron con anticuerpos anti-CD3 seguido de incubación con células MDA-MB-231 que sobreexpresan hCD80 en presencia de 4 $\mu\text{g/ml}$ de la mAbs indicados

durante 5-9 días. La proliferación se midió mediante diluciones CFSE. Se muestran datos representativos de al menos 5 experimentos diferentes. * p< 0,04 ** < 0,015 *** <0,0004.

Figura 9: mAb anti-TIGIT VSIG9#1 sinergiza con anti PD-1 y anti CTLA-4 para aumentar las células T CD8 en células de LMA. Las células inmunitarias separadas del aspirado de médula ósea obtenido de un paciente con LMA se cocultivaron con 4 µg/ml de anticuerpos anti TIGIT, anti PD-1 y/o anti CTLA-4 durante 12 días y luego se determinó la cantidad de células T CD8 determinada .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 **[0069]** La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales como se define en las reivindicaciones adjuntas, que son específicos para la proteína humana TIGIT, algunos de los mAb tienen una afinidad excepcionalmente alta por esta proteína y algunos tienen doble especificidad, y pueden unirse diferentes dominios de la proteína. La invención también proporciona el uso de mAbs como agentes terapéuticos. En particular, los mAbs de la presente invención se pueden usar, solos o en combinación con otros agentes, para restaurar y aumentar la actividad antitumoral de NK y otras células, y como reactivos de diagnóstico.

15 **[0070]** El término "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de provocar la formación de anticuerpos y que se une específicamente a un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más de un epítopo. La unión específica a la que se hace referencia anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará, de una manera muy selectiva, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser provocados por otros antígenos. Un antígeno según algunas formas de realización de la presente invención es una proteína TIGIT, que tiene un número de acceso seleccionado del grupo que consiste en: NP_776160.2; Q495A1.1; AAI01290.1; AAI01291.1; AAI01292.1; ACD74757.1; EAW79602.1; y AIC53385.1; o un fragmento de cualquiera de dichas proteínas TIGIT.

20 **[0071]** Los anticuerpos monoclonales de la presente invención son específicos de TIGIT humana. Los mAbs según la invención se unen a TIGIT humana y al menos una TIGIT de otras especies, como ratón, mono, perro u otras. De acuerdo con algunas formas de realización específicas, los mAb se unen a TIGIT humana ya al menos una especie de mono TIGIT.

25 **[0072]** El término "determinante antigénico" o "epítopo", como se usa en el presente documento, se refiere a la región de una molécula de antígeno que reacciona específicamente con un anticuerpo particular. Las secuencias peptídicas derivadas de un epítopo se pueden usar, solas o junto con un resto portador, aplicando métodos conocidos en la técnica, para inmunizar animales y producir anticuerpos policlónicos o monoclonales adicionales. Los péptidos aislados derivados de un epítopo pueden usarse en métodos de diagnóstico para detectar anticuerpos.

30 **[0073]** Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, comprenden dos cadenas pesadas unidas entre sí por enlaces disulfuro y dos cadenas ligeras, estando cada cadena ligera unida a una cadena pesada respectiva por enlaces disulfuro en una configuración en forma de "Y". La digestión proteolítica de un anticuerpo produce dominios Fv (fragmento variable) y Fc (fragmento cristalino). Los dominios de unión a antígeno, Fab, incluyen regiones en las que varía la secuencia polipeptídica. El término F(ab')₂ representa dos brazos Fab' unidos entre sí por enlaces disulfuro. El eje central del anticuerpo se denomina fragmento Fc. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes (C_H). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante (C_L) en su otro extremo, estando alineado el dominio variable de la cadena ligera con el dominio variable de la cadena pesada y estando alineado el dominio constante de la cadena ligera con el primer dominio constante de la cadena pesada (CHI). Los dominios variables de cada par de cadenas ligeras y pesadas forman el sitio de unión al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco, cuyas secuencias están relativamente conservadas, unidas por tres dominios hipervariables conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR 1-3). Estos dominios contribuyen a la especificidad y afinidad del sitio de unión al antígeno.

35 **[0074]** Determinación de CDR: la identificación de CDR a partir de una secuencia variable de cadena ligera o pesada dada se realiza normalmente utilizando uno de los pocos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, tal determinación se realiza según el Kabat (Wu T.T. and Kabat E.A., J Exp Med, 1970; 132:211-50) y el IMGT (Lefranc M-P, et al., Dev Comp Immunol, 2003, 27:55-77).

40 **[0075]** Cuando se usa el término "CDR que tiene una secuencia", o un término similar, incluye opciones en las que la CDR comprende las secuencias especificadas y también opciones en las que la CDR consiste en la secuencia especificada.

45 **[0076]** La especificidad antigénica de un anticuerpo se basa en las regiones hipervariables, es decir, las secuencias CDR únicas de las cadenas ligera y pesada que juntas forman el sitio de unión al antígeno.

50 **[0077]** El isotipo de la cadena pesada (gamma, alfa, delta, epsilon o mu) determina la clase de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, respectivamente). La cadena ligera es de dos tipos (kappa, κ o lambda, λ) que se encuentran en todas las clases de anticuerpos.

5 [0078] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos el tiempo suficiente para exhibir la actividad biológica deseada, es decir, la unión a TIGIT humana.

10 [0079] El anticuerpo o anticuerpos según la invención incluyen anticuerpos intactos, como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (mAb), así como fragmentos proteolíticos de los mismos, como los fragmentos Fab o F(ab')₂. Los anticuerpos de cadena sencilla también caen dentro del alcance de la presente invención.

15 [0080] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluyen un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, conservan la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos abarcados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CHI; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CHI; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios VH y CHI; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CHI y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CHI; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 1989, 341, 544-546) que consta de un dominio VH; (vii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (viii) moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, Fv de cadena sencilla; scFv) (Bird et al., *Science* 1988, 242, 423-426; y Huston et al., *PNAS (USA)* 1988, 85, 5879-5883); (ix) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véanse, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 1993, 90, 6444-6448).

25 Fragментos de anticuerpos

30 [0081] Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv).

40 [0082] El término "anticuerpo monoclonal" como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse en el sentido de que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Los mAbs se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 1975, 256, 495, o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al., *Nature* 1991, 352, 624-628 o Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 1991, 222:581-597.

50 [0083] El diseño y desarrollo de moléculas de unión a antígeno monovalentes recombinantes derivadas de anticuerpos monoclonales a través de la identificación y clonación rápidas de los genes funcionales variables pesados (VH) y variables ligeros (VL) y el diseño y clonación de una secuencia de ADN sintética optimizada para expresión en bacterias recombinantes se describen en Fields et al. 2013, 8(6): 1125-48.

60 [0084] Los mAbs de la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA. Un hibridoma que produce un mAb puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Se pueden obtener títulos elevados de mAb mediante la producción *in vivo* en la que se inyectan por vía intraperitoneal células de los hibridomas individuales en ratones Balb/c cebados con pristina para producir líquido de ascitis que contiene altas concentraciones de los mAb deseados. Los mAb de isotipo IgM o IgG pueden purificarse a partir de tales fluidos ascíticos, o a partir de sobrenadantes de cultivo, usando métodos de cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

65 [0085] Además del método convencional de generar anticuerpos *in vivo*, los anticuerpos pueden generarse *in vitro* usando tecnología de presentación en fagos. Tal producción de anticuerpos recombinantes es mucho más rápida en comparación con la producción de anticuerpos convencionales y pueden generarse contra una enorme cantidad de antígenos. Además,

cuando se usa el método convencional, muchos antígenos resultan no inmunogénicos o extremadamente tóxicos y, por lo tanto, no pueden usarse para generar anticuerpos en animales. Además, la maduración de la afinidad (es decir, el aumento de la afinidad y la especificidad) de los anticuerpos recombinantes es muy sencilla y relativamente rápida. Finalmente, se pueden generar grandes cantidades de anticuerpos diferentes contra un antígeno específico en un procedimiento de selección. Para generar mAbs recombinantes, se pueden usar varios métodos, todos basados en bibliotecas de visualización para generar una gran cantidad de anticuerpos con diferentes sitios de reconocimiento de antígenos. Tal biblioteca se puede hacer de varias maneras: se puede generar un repertorio sintético mediante la clonación de regiones CDR sintéticas en un grupo de genes de línea germinal de cadena H y generar así un gran repertorio de anticuerpos, a partir del cual se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos recombinantes con diversas 5 especificidades. Se puede utilizar la reserva de linfocitos humanos como material de partida para la construcción de una biblioteca de anticuerpos. Es posible construir repertorios ingenuos de anticuerpos IgM humanos y crear así una biblioteca humana de gran diversidad. Este método ha sido ampliamente utilizado con éxito para seleccionar un gran número de anticuerpos frente a diferentes antígenos. Se proporcionan protocolos para la construcción de bibliotecas de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes, por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, Colligan et al (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Capítulo 17, Sección 17.1.

[0086] Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En un método, las CDR no humanas se insertan en una secuencia FR de anticuerpo humano o de anticuerpo consenso. A continuación se pueden introducir cambios adicionales en el marco del anticuerpo para modular la afinidad o la 10 inmunogenicidad.

[0087] Por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 5.585.089 de Queen et al. describe una inmunoglobulina humanizada y métodos para prepararla, en los que la inmunoglobulina humanizada comprende CDR de una inmunoglobulina donante y 25 FR de región VH y VL de cadenas H y L de inmunoglobulina aceptora humana, en donde dicha inmunoglobulina humanizada comprende aminoácidos de la inmunoglobulina donante FR fuera de las CDR de Kabat y Chothia, y en las que los aminoácidos donantes reemplazan los aminoácidos correspondientes en las estructuras de la cadena H o L de la inmunoglobulina aceptora.

[0088] También se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos tales como otros mamíferos para expresar 30 anticuerpos humanizados.

[0089] La Patente de EE. UU. Nº 5.225.539, de Winter, también describe un anticuerpo alterado o fragmento de unión a antígeno del mismo y métodos para prepararlo, donde un dominio V del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene las FR de una primera inmunoglobulina H o El dominio V de la cadena L y las CDR de un segundo dominio VH o VL de 35 inmunoglobulina, donde dicho segundo dominio VH o VL de inmunoglobulina es diferente de dicho primer dominio VH o VL de inmunoglobulina en especificidad de unión a antígeno, afinidad de unión a antígeno, estabilidad, especie, clase o subclase.

[0090] Los anticuerpos anti-idiotipo específicamente inmunorreactivos con las regiones hipervariables de un anticuerpo 40 de la invención también están comprendidos.

[0091] Alternativamente, la tecnología de presentación de fagos se puede utilizar para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia TIGIT humana, ya sea de repertorios de genes v amplificados por PCR de linfocitos de 45 humanos examinados para poseer anti-VEGF o de bibliotecas (McCafferty, et al., (1990), Nature 348, 552-554, Marks y col., (1992) Biotechnology 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos también puede mejorarse, por ejemplo, mediante el barajado de cadenas (Clackson et al., (1991) Nature 352:628).

[0092] Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden emplear para aislar o identificar clones que expresan los polipéptidos para purificar los polipéptidos, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

[0093] La invención proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno (ABD) que se caracteriza por las tres CDR de su cadena ligera y las tres CDR de su cadena pesada como se define en la reivindicación 1, donde dicho ABD tiene al menos 90 % de identidad o similitud de secuencia con un ABD de un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende: (i) una cadena variable pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y una cadena variable ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 (identificado aquí como VSIG9#1). Tal anticuerpo puede tener un dominio ABD que tiene al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96, al menos 97, al menos 98, al menos 99 % identidad de secuencia o similitud o 100 % de identidad de secuencia con el ABD correspondiente de VSIG9#1

[0094] La identidad de secuencia es la cantidad de aminoácidos o nucleótidos que coinciden exactamente entre dos secuencias diferentes. La similitud de secuencia permite determinar la sustitución conservadora de aminoácidos como aminoácidos idénticos.

[0095] La invención también proporciona variantes conservativas de aminoácidos de las moléculas de anticuerpo según la invención, siempre que las variantes conserven las seis CDR que caracterizan al anticuerpo de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

5 [0096] También se pueden hacer variantes según la invención que conserven la estructura molecular global de las proteínas codificadas. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales que comprenden los productos proteicos descritos, el experto reconocerá algunas sustituciones racionales. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, sustituciones conservativas, se pueden realizar, por ejemplo, en base a la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados.

10 [0097] El término "variante de anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que comprende el anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas de fusión en las que el anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión a antígeno está unido a otra entidad química se considera una variante del anticuerpo.

15 [0098] El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígenos no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica.

20 [0099] Los términos "molécula que tiene la porción de unión a antígeno de un anticuerpo" y "fragmentos de unión a antígeno" como se usan en este documento pretenden incluir no solo moléculas de inmunoglobulina intactas de cualquier isotipo y generadas por cualquier línea celular animal o microorganismo, sino también la fracción reactiva de unión a antígeno del mismo, incluidos, entre otros, el fragmento Fab, el fragmento Fab', el fragmento F(ab')₂, la porción variable de sus cadenas pesada y/o ligera, los minianticuerpos Fab (ver, por ejemplo, WO 93/15210, solicitud de patente de EE. UU. 08/256.790, WO 96/13583, solicitud de patente de EE. UU. 08/817.788, WO 96/37621, solicitud de patente de EE. UU. 08/999.554), minianticuerpos biespecíficos diméricos (ver Muller et al. al., FEBS Lett., 31 de julio de 1998; 432(1-2):45-9) y anticuerpos monocatenarios que incorporan dicha fracción reactiva, así como cualquier otro tipo de molécula 25 en la que se haya insertado físicamente dicha fracción reactiva de anticuerpo. Dichas moléculas pueden proporcionarse mediante cualquier técnica conocida, incluidas, entre otras, la escisión enzimática, la síntesis de péptidos o las técnicas recombinantes.

30 [0100] El término "anticuerpo monoclonal no completamente humanizado" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo monoclonal, que tiene dominios variables de cadena pesada y/o una cadena ligera en los que las secuencias de aminoácidos que flanquean y/o son inmediatamente adyacentes a las CDR no son completamente humanas, es decir, no son idénticas a ninguna secuencia homóloga o correspondiente conocida tomada de anticuerpos humanos naturales.

35 Anticuerpos humanizados y humanos

40 [0101] Un anticuerpo humanizado, típicamente tiene una FR humana injertada con CDR no humanas. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado tiene una o más secuencias de aminoácidos introducidas desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por CDR de roedor o secuencias de CDR. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químicos (Patente de EE. UU. Nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio V humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

50 [0102] La elección de los dominios VH y VL humanos que se utilizarán para fabricar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la inmunogenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio V de un anticuerpo de roedor se analiza frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio humano conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta entonces como FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método usa un FR particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas H o L. El mismo FR puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

55 [0103] Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta especificidad y afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas pantallas permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los

residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas para lograr la característica de anticuerpo deseada, como una mayor afinidad por los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directa y sustancialmente implicados en la influencia de la unión al antígeno.

- 5 [0104] Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión a la cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones químéricos y mutantes de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. UU., 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993); y Duchosal et al. Nature 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden derivarse de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), Vaughan y col., Nature Biotech 14:309 (1996)).

15 Farmacología

20 [0105] En las formulaciones farmacéuticas y de medicamentos, el agente activo se utiliza preferiblemente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, cualquier otro ingrediente terapéutico. El o los vehículos deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no indebidamente perjudiciales para el receptor de la misma. El principio activo se proporciona en una cantidad eficaz para lograr el efecto farmacológico deseado, como se describe anteriormente, y en una cantidad adecuada para lograr la dosis diaria deseada.

25 [0106] Normalmente, los anticuerpos y sus fragmentos y conjugados de la presente invención que comprenden la porción de unión a antígeno de un anticuerpo o que comprenden otro polipéptido que incluye un péptido mimético se suspenderán en una solución salina estéril para usos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse alternativamente para controlar la liberación del ingrediente activo (molécula que comprende la porción de un anticuerpo que se une al antígeno) o para prolongar su presencia en el sistema de un paciente. Se conocen numerosos sistemas 30 adecuados de suministro de fármacos e incluyen, por ejemplo, sistemas implantables de liberación de fármacos, hidrogeles, hidroximetilcelulosa, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, microesferas y similares. Las preparaciones de liberación controlada se pueden preparar mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber la molécula según la presente invención. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de polí(etileno-co-acetato de vinilo) y 35 matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebárico. La velocidad de liberación de la molécula según la presente invención, es decir, de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de dicha matriz depende del peso molecular de la molécula, la cantidad de la molécula dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas.

[0107] La composición farmacéutica de esta invención se puede administrar por cualquier medio adecuado, como por vía oral, tópica, intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraarticular, intralesional o parenteral. 40 Normalmente, la administración intravenosa (iv) se usa para administrar anticuerpos.

[0108] Será evidente para los expertos en la técnica que la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula según la 45 presente invención dependerá, entre otras cosas, del programa de administración, la dosis unitaria de molécula administrada, si la molécula se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, el estado inmunológico y de salud del paciente, la actividad terapéutica de la molécula administrada y el juicio del médico tratante. Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una molécula requerida para aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno que se está tratando durante un período de tiempo.

[0109] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede 50 reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, retrasar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia in vivo se puede medir, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión 55 de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

[0110] El cáncer modificable para el tratamiento puede incluir, pero no se limita a: carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o cáncer de estómago (incluido el cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer 60 colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como

linfoma de células B (incluido el linfoma no Hodgkin (LNH) folicular de bajo grado); el LNH de linfocitos pequeños (SL); el LNH folicular/de grado intermedio; LNH difuso de grado alto, LNH inmunoblástico de alto grado, LNH linfoblastico de alto grado, LNH de células pequeñas no escindidas de alto grado, LNH de enfermedad voluminosa, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no Hodgkins (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de células blandas, sarcoma tisular, sarcoma de Kaposi, carcinoma carciñoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. Las condiciones cancerosas modificables para el tratamiento de la invención incluyen cánceres metastásicos.

[0111] Las moléculas de la presente invención como ingredientes activos se disuelven, dispersan o mezclan en un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el ingrediente activo como es bien conocido. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH.

[0112] La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar junto con una composición antineoplásica.

[0113] El término "Tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

[0114] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen melanoma, cáncer de pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hígado, vejiga, riñón, cuello uterino, páncreas, leucemia, linfoma, mieloide, ovario, útero, sarcoma, biliar o endometrial.

[0115] El método para tratar el cáncer comprende administrar la composición farmacéutica como parte de un régimen de tratamiento que comprende la administración de al menos un agente anticanceroso adicional.

[0116] El agente anticancerígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un taxano, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor de topoisomerasa II, una asparaginasa, un agente alquilante, un antibiótico antitumoral y combinaciones de los mismos. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la invención.

[0117] El antimetabolito puede seleccionarse del grupo que consiste en citarabina, gludarabina, fluorouracilo, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, gemcitabina e hidroxiurea. El inhibidor mitótico se puede seleccionar del grupo que consiste en vincristina, vinblastina y vinorelbina. El inhibidor de topoisomerasa se puede seleccionar del grupo que consiste en topotecan e irinotecan. El agente alquilante puede seleccionarse del grupo que consiste en busulfán, carbustina, lomustina, clorambucilo, ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, ifosamida, mecloretamina, melfalán, tiotepa, dacarbazine y procarbazina. El antibiótico antitumoral se puede seleccionar del grupo que consiste en bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, mitomicina, mitoxantrona y plicamicina. De acuerdo con algunas formas de realización, la topoisomerasa II se selecciona del grupo que consiste en etopósido y tenipósido.

[0118] El agente anticanceroso puede seleccionarse del grupo que consiste en bevacizumab, carboplatino, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorrubicina, clorhidrato de gemcitabina, clorhidrato de topotecán, tiotepa y combinaciones de los mismos.

[0119] Los anticuerpos monoclonales según la presente invención se pueden usar como parte de una terapia combinada con al menos un agente anticanceroso. El agente anticancerígeno adicional puede ser un inmunomodulador, un linfocito activado, un inhibidor de quinasa o un agente quimioterapéutico.

[0120] El agente anticanceroso puede ser un inmunomodulador, ya sea agonista o antagonista, tal como un anticuerpo contra una molécula de punto de control.

[0121] El bloqueo de inmunoterapia de punto de control ha demostrado ser un nuevo y emocionante lugar para el tratamiento del cáncer. Las vías de los puntos de control inmunitarios constan de una gama de moléculas inhibidoras y coestimuladoras que trabajan en conjunto para mantener la autotolerancia y proteger los tejidos del daño del sistema inmunitario en condiciones fisiológicas. Los tumores se aprovechan de ciertas vías de puntos de control para evadir el sistema inmunitario. Por lo tanto, la inhibición de dichas vías se ha convertido en una estrategia prometedora de tratamiento contra el cáncer.

- 5 [0122] El anticuerpo anti-linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4) ipilimumab (aprobado en 2011) fue el primer agente inmunoterapéutico que mostró un beneficio para el tratamiento de pacientes con cáncer. El anticuerpo interfiere con las señales inhibidoras durante la presentación del antígeno a las células T. El anticuerpo pembrolizumab (aprobado en 2014) contra la muerte celular programada 1 (PD-1) bloquea la señalización inmunoregulatoria negativa del receptor PD-1 expresado por las células T. Un agente anti-PD-1 adicional se presentó para aprobación regulatoria en 2014 para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La investigación activa actualmente está explorando muchos otros puntos de control inmunitarios, entre ellos: CEACAM1, gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), CD137, OX40 (también conocido como CD134) y receptores similares a inmunoglobulinas de células asesinas (KIR).
- 10 [0123] De acuerdo con algunas formas de realización específicas, el inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo que inhibe CTLA-4, una proteína 1 de muerte celular programada antihumana (PD-1), anticuerpo PD-L1 y PD-L2, un linfocito citotóxico activado, un agente activador de linfocitos, un anticuerpo contra CEACAM y un inhibidor de la vía RAF/MEK. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. De acuerdo con algunas formas de realización específicas, el inmunomodulador adicional se selecciona de mAb a PD-1, mAb a PD-L1, mAb a PD-L2, mAb a CEACAM1, mAb a CTLA-4, interleucina 2 (IL-2) o célula asesina activada por linfoquinas (LAK).
- 20 [0124] De acuerdo con otras formas de realización, el agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico. El agente de quimioterapia, que podría administrarse junto con el anticuerpo según la presente invención, o por separado, puede comprender cualquier agente conocido en la técnica que muestre actividad anticancerígena, incluidos, entre otros: mitoxantrona, inhibidores de la topoisomerasa, veneno del huso vincas: vinblastina, vincristina, vinorelbina (taxol), paclitaxel, docetaxel; agentes alquilantes: mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida; metotrexato; 6-mercaptopurina; 5-fluorouracilo, citarabina, gencitabina; podofilotoxinas: etopósido, irinotecán, topotecán, dacarbazina; 25 antibióticos: doxorubicina (adriamicina), bleomicina, mitomicina; nitrosoureas: carmustina (BCNU), lomustina, epirubicina, idarrubicina, daunorrubicina; iones inorgánicos: cisplatino, carboplatino; interferón, asparaginasa; hormonas: tamoxifeno, leuproldida, flutamida y acetato demegestrol.
- 30 [0125] El agente quimioterapéutico se puede seleccionar de agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, sustitutos de antracenodiona, urea, derivados de metilhidrazina, supresor adrenocortical, adrenocorticosteroides, progestágenos, estrógenos, antiestrógenos, andrógenos, antiandrógenos y análogos de la hormona liberadora de gonadotropina. El agente quimioterapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV), 35 irenotecán, oxaliplatino, capecitabina, paclitaxel y doxetaxel. Se pueden usar uno o más agentes quimioterapéuticos.
- 40 [0126] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica según la presente invención es para uso en el tratamiento del cáncer. El cáncer puede seleccionarse de pulmón, tiroides, mama, colon, melanoma, próstata, hígado, vejiga, riñón, cuello uterino, páncreas, leucemia, linfoma, mieloide, ovario, útero, sarcoma, biliar y cáncer de células endometriales. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la invención.
- 45 [0127] La composición farmacéutica, que comprende al menos un anticuerpo o fragmento del mismo según la presente invención, y una composición farmacéutica que comprende un inmunomodulador adicional o un inhibidor de cinasa, pueden usarse en el tratamiento del cáncer mediante administración separada.
- 50 [0128] La presente descripción proporciona un método útil en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo según la presente invención.
- 55 [0129] El término "tratar" se refiere a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio o la mejora de uno o más síntomas asociados con la distrofia muscular, el retraso o la ralentización de esa deficiencia, la mejora, la paliación o la estabilización de esa deficiencia y otros resultados beneficiosos.
- 60 [0130] El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente del anticuerpo monoclonal del fragmento de anticuerpo que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto terapéutico pretendido. La cantidad efectiva requerida para lograr el resultado final terapéutico puede depender de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, el tipo específico de tumor y la gravedad del estado del paciente, y si la combinación se coadministra además con radiación. La cantidad efectiva (dosis) de los agentes activos, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, que incluye, entre otros, la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción de la tasa de crecimiento tumoral, prevención del crecimiento de tumores y metástasis y mejora de la supervivencia.
- 65 [0131] La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones descritas en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, mediante la determinación de la CI50 (la concentración que proporciona una inhibición del 50 %) y la dosis

máxima tolerada para un compuesto en cuestión. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo, entre otras cosas, de la forma de dosificación empleada, el régimen de dosificación elegido, la composición de los agentes utilizados para el tratamiento y la vía de administración utilizada, entre otros factores relevantes. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente. Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación también puede ser una sola administración de una composición de liberación lenta, con un ciclo de tratamiento que dura desde varios días hasta varias semanas o hasta que se logra la curación o la disminución del estado de la enfermedad. La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico, y todos los demás factores relevantes.

[0132] El término "administrar" o "administración de" una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto puede llevarse a cabo usando uno de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un compuesto o un agente puede administrarse por vía enteral o parenteral. Enteral se refiere a la administración a través del tracto gastrointestinal, incluido por vía oral, sublingual o rectal. La administración parenteral incluye la administración por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, ocular, sublingual, intranasal, por inhalación, intraespinal, intracerebral, y transdérmicamente (por absorción, por ejemplo, a través de un conducto de la piel). Un compuesto o agente también puede ser introducido apropiadamente mediante dispositivos poliméricos recargables o biodegradables u otros dispositivos, por ejemplo, parches y bombas, o formulaciones, que proporcionan la liberación prolongada y lenta o controlada del compuesto o agente. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o uno o más períodos prolongados. En algunas formas de realización, la administración incluye tanto la administración directa, incluida la autoadministración, como la administración indirecta, incluido el acto de recetar un fármaco. Por ejemplo, como se usa aquí, un médico que instruye a un paciente para que se autoadministre un fármaco, o para que otro administre el fármaco y/o que proporciona al paciente una receta para un fármaco, le está administrando el fármaco al paciente.

[0133] Los anticuerpos generalmente se administran en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg de peso del paciente, comúnmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/kg, y con frecuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg. A este respecto, se prefiere usar anticuerpos que tengan una vida media circulante de al menos 12 horas, preferiblemente de al menos 4 días, más preferiblemente de hasta 21 días. Se espera que los anticuerpos químéricos y humanizados tengan vidas medias circulatorias de hasta cuatro y hasta 14-21 días, respectivamente. En algunos casos, puede ser ventajoso administrar una dosis de carga grande seguida de dosis de mantenimiento periódicas (p. ej., semanalmente) durante el período de tratamiento. Los anticuerpos también pueden administrarse mediante sistemas de administración de liberación lenta, bombas y otros sistemas de administración conocidos para infusión continua.

[0134] El término "alrededor de" significa que debe asumirse un rango de error aceptable, por ejemplo, hasta 5% o 10%, para el valor particular.

[0135] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas formas de realización de la invención. Sin embargo, de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

Procedimientos experimentales

[0136] Se inhibe la citotoxicidad de las células NK de varios tumores debido a la unión del ligando a la proteína TIGIT presente en todas las células NK humanas y en varias células T. Se generaron mAb anti-hTIGIT y se probaron en cuanto a su capacidad para antagonizar la inhibición de la destrucción impuesta por la interacción del ligando con hTIGIT.

[0137] Se usaron las siguientes líneas celulares: las células 721.221 transformadas con EBV humano, la línea celular tumoral NK humana YTS ECO, células de melanoma MEL562, células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células hepatocelulares humanas HepG2. La generación de los diversos transfectantes YTS ECO: YTS hTIGIT se describió previamente (Stanietzky et al., 2009). Todas las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con FCS al 10%.

[0138] Para los ensayos de destrucción, las células diana se cultivaron durante la noche en presencia de 35 S-Metionina añadida a un medio libre de metionina (Sigma). Antes de la incubación con las células efectoras (células NK), las células se lavaron, contaron y se sembraron en placa 5000 células/pocillo. Se utilizaron 0,5 mg de mAb de anticuerpo bloqueante. Para cada diana, la liberación espontánea de ³⁵S se calculó utilizando células, que no se incubaron con células efectoras, y la liberación máxima de ³⁵S se calculó aplicando 100 µl de NaOH 0,1 M a las células diana. La cantidad de liberación de [35S] se midió después de 5 horas de incubación con efectores (a 37°C) mediante un contador β MicroBeta ² (PerkinElmer).

Determinación de K_D usando Biacore

[0139] Se usó Biosensor Biacore™ T100 (GE Healthcare) de resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar

Koff, Kon y K_D entre los anticuerpos y TIGIT.

Ejemplo 1. Producción de anticuerpos monoclonales específicos de TIGIT

- 5 [0140] Se generaron anticuerpos monoclonales contra TIGIT humana según un ejemplo, inmunizando con la proteína de fusión TIGIT-Fc. La secuencia codificante de TIGIT humana se produjo clonando como una fusión con el fragmento Fc de IgG1. La proteína de fusión recombinante generada se inyectó a ratones y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para el reconocimiento específico de transfectantes de la línea celular YTS NK que expresan TIGIT.
- 10 [0141] Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma resultantes siguiendo el manual técnico del reactivo TRIzol® (Ambion, Cat. No.: 15596-026) y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN total se transcribió inversamente en ADNc utilizando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales siguiendo el manual técnico de PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Cat. No.: 6110A). Los fragmentos de anticuerpos de VH, VL, CH y CL se amplificaron según un procedimiento operativo estándar de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE). Los fragmentos de anticuerpos amplificados se clonaron por separado en un vector de clonación estándar utilizando procedimientos de clonación molecular estándar.
- 15 [0142] Se realizó el cribado por PCR de colonias para identificar clones con insertos de tamaños correctos. Se secuenciaron no menos de cinco colonias individuales con insertos de tamaños correctos para cada fragmento de anticuerpo.

Resultados

- 20 [0143] Dos ejemplos de anticuerpos monoclonales específicos para TIGIT humana producidos se denominaron #4 (o 258-cs1#4) y VSIG9#1 (o Vsig9.01). Estos mAbs reconocen las células YTS transfectadas con TIGIT humano como se demuestra en la Figura 1A.
- [0144] El ARN total aislado de la muestra se analizó junto con un marcador de ADN Marcador III (TIAGEN, Cat No.: MD103) en un gel de agarosa al 1,5 %/GelRed™.
- 25 [0145] Se corrieron cuatro microlitros de productos de PCR de cada muestra junto con el marcador de ADN III en gel de agarosa al 1,5 %/GelRed™. Los productos de PCR se purificaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.
- 30 [0146] Se secuenciaron los VH, VL de diferentes clones. Las secuencias de las regiones variables, enumeradas a continuación, son de los anticuerpos producidos por dos clones de hibridomas denominados VSIG9#1 y 258-cs1.04. Las secuencias de CDR en cada cadena de aminoácidos están subrayadas.

Anticuerpo VSIG9#1 Cadena pesada: secuencia de ADN

40 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCCTGGGCTTCAGTGAA
GCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATGGTATAAGCTGGTGAA
GCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTATCCCAGAACAGTGTA
45 ATACTTACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCC
TCCAGCACAGCGTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
TTCTGTGCAAGAAAGGGACCCTACTATACTAAGAACGAGGACTACTGGGGCCAAGG
50 CACCATTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:9)

Anticuerpo VSIG9#1 Cadena pesada: secuencia de aminoácidos

55 QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNT
YYNEFKKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCARKGPYYTKNEDYWGQGTI
LTVSS (SEQ ID NO:7).

60 Anticuerpo VSIG9#1 Cadena ligera: secuencia de ADN

5 GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTC
 ACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGCACATTACTACAGTTAGCATGGTATCAGCAG
 AAGCAAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGAAGATGG
 10 TGTCCCATCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGACACAATATTCTATGAAGATCAA
 CAGCATGCAGCCTGAAGATAACCGCAACTTATTCTGTAAACAGGCTATGACGTTCC
 TCGGACCTCGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAAACAGGG
 15 CTGATGCTGCACCAACTGTATCC (SEQ ID NO:10).

Anticuerpo VSIG9#1 Cadena ligera: secuencia de aminoácidos

20 DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASEHIYYSLAWYQQKQGKSPQLLIYNANSLEDGVP
 SRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDVPRTFGGGTKLEIKRADAAPTVS

(SEQ ID NO: 8)

Anticuerpo 258-cs1.04 (también denominado #4)**25 Anticuerpo 258-cs1.04 Cadena pesada: secuencia de ADN**

30 CAGGTCCAAGTGCTGCAGCCTGGGCTGAAGCTGGTAAGCCTGGGCTTCAGTGAA
 GCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTCACCATCTACTGTATACTGGGTGAA
 GCAGAGGCCTGGACAAGGCCTGAGTGGATTGGAGAGATTAGTCCTAGAACGGTC
 35 GTACTATCTACAATGAGAAGTTCAAGAACAAAGGCCACACTGACTATAGACAAATCC
 TCCACCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTCGGGTCTAT
 TGCTGTGCAATATCGGATGGTTACGACGGATACTACTTGACTACTGGGCCAGGC
 ACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:20).

Anticuerpo 258-cs1.04_Cadena pesada: secuencia de aminoácidos

40 QVQLLQPGAEVLVKPGASVKLSCKASGYTFTIYCIHWVKQRPGQGLEWIGEISPSNGRTI
YNEKFKNKATLTIDKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYCCAISSDGYDGYYFDYWGQQGTTLT

45 VSS (SEQ ID NO:18).

Anticuerpo 258-cs1.04_Cadena ligera: secuencia de ADN

50 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTGGGAGAAAGAGTC
 AGTCTCACTTGTGGCAAGTCAGGAAATTAGTGGTTACTAAACTGGCTTCAGCAG
 AAACCCAGATGGAACATTAAACGCCTGATCTACGCCGCATCCACTTAGATTCTGGT
 55 GTCCCCAAAAGGTTAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAAGATTATTCTCTCACCATCAGC
 AGACTTGAGTCTGAAGATTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTATCCTC
 GGACGTTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO:21).

60 Anticuerpo 258-cs1.04_Cadena ligera: secuencia de aminoácidos

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLNWLQQKPDGTIKRLIYAASTLDSGVPK
 RFSGRSGSDYSLTISRLESEDFA~~DYYC~~LQYASYPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:19).

65 La Tabla 1 enumera las secuencias de aminoácidos de la región variable y CDR de los dos mAb TIGIT antihumanos y las

secuencias de región variable.

Tabla 1.

5	CDR	VSIG9#1	SEQ ID No.	258-cs1.04	SEQ ID No.
	HCDR1	GYTFTSYGIS	1	AIJCIH	12
	HCDR2	EIYPRSGNTYYNEKFKG	2	EISPSNGRTIYNEKFKN	13
	HCDR3	KGPYYTKNEDY	3	SDGYDGYYFDY	14
10	LCDR1	RASEHIYYSLA	4	RASQEISGYLN	15
	LCDR2	NANSLED	5	AASTLDS	16
	LCDR3	KQAYDVPRT	6	LQYASYPRT	17
	VH	Secuencia de aminoácidos	7	Secuencia de aminoácidos	18
15	VH	Secuencia de polinucleótidos	9	Secuencia de polinucleótidos	20
	VL	Secuencia de aminoácidos	8	Secuencia de aminoácidos	19
	VL	Secuencia de polinucleótidos	10	Secuencia de polinucleótidos	21

Ejemplo 2 Expresión amplia de TIGIT en células inmunitarias efectoras.

[0147] Para examinar el reconocimiento de TIGIT por los mAb, se incubaron 2×10^5 células de sobreexpresión YTS-TIGIT (como se describió previamente por Stanietsky et al., *ibid*) con 0,2 microgramos de clon de mAb anti TIGIT VSIG9#1 o #4 en hielo durante 30 min. Después de dos rondas de lavado en tampón FACS, se añadió conjugado Alexa Fluor® 647 de anticuerpo secundario IgG (H+L) anti-ratón de cabra (BioLegend) durante 30 minutos adicionales en hielo. Como se muestra en la Figura 1A, los mAbs reconocen las proteínas TIGIT en las células que sobreexpresan YTS-TIGIT (curva derecha), pero no en las células YTS. Se usó mlG como control. A continuación, se examinó el VSIG9#1 en células NK activadas de dos donantes sanos. Como se muestra en la Figura 1B, el mAb reconoció las células NK (curva derecha en las gráficas de histograma FACS). Se usó mlG como control (curva izquierda).

[0148] A continuación, se examinó el VSIG9#1 en dos poblaciones de células T CD8+, obtenidas de pacientes con melanoma (TIL-I y TIL-II). Como se muestra en la Figura 1C, el mAb reconoció las células T (curva derecha en las gráficas de histograma FACS). Se usó mlG como control (curva izquierda). En general, las figuras 1A-1C muestran una amplia expresión de TIGIT en células inmunitarias y demuestran que el mAb VSIG9#1 puede unirse a células inmunitarias.

Ejemplo 3. Anti-TIGIT VSIG9#1 bloquea la unión de TIGIT-Fc a las células tumorales.

[0149] Para examinar el efecto de VSIG9#1 sobre la unión de TIGIT-Fc a las células tumorales, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células HepG2 (que expresan altos niveles de PVR, Nectin-2 y Nectin-3) con 25 microgramos/pocillo de hTIGIT-Fc sin mAb (Figura 2A, flecha 1) con mlG (Figura 2A, flecha 2) o con anti-TIGIT-VSIG9#1 a las concentraciones indicadas (Figura 2A, flechas 3 y 4) durante 30 min en hielo, la detección se realizó utilizando Alexa Fluor® 647 IgG anti-humano (BioLegend). La expresión de ligandos TIGIT, PVR, Nectin-2 y Nectin-3 en las células HepG2 se demuestra en la Figura 2B.

[0150] Los resultados demuestran que el mAb puede prevenir la unión de TIGIT a las células tumorales, lo que sugiere que el anticuerpo es capaz de prevenir la inhibición de la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 4. El mAb VSIG9#1 potencia la actividad destructora.

[0151] Para examinar el efecto de los mAb anti-TIGIT en la actividad destructora de las células efectoras, se incubaron células YTS-TIGIT NK con células 721.221-PVR marcadas con ^{35}S en presencia de 2,5 microgramos/ml de control mlG (barra izquierda) o antiTIGIT VSIG9#1 (barra derecha)(* p< 0,02). La matanza específica se calculó como se ha descrito previamente (Stanietsky et. al *ibid*). El porcentaje de destrucción se examinó después de 5 horas. Como se muestra en la Figura 3A, el mAb VSIG9#1 anti TIGIT mejora la actividad letal. A continuación, se examinó la actividad de eliminación específica de células de tumor de mama humano MDA-MB-231 que se marcaron con ^{35}S y se incubaron con células NK de donantes sanos en presencia de control mlG (barra izquierda) o VSIG9#1 (barras derechas). El porcentaje de destrucción se midió después de 5 horas (** p<0,002). Como se muestra en la Figura 3B, VSIG9#1 mejora el efecto letal. La actividad destructora específica de dos anticuerpos también se examinó con células de melanoma MEL562. Como se muestra en la Figura 3C, los dos mAbs, 258-CS1#4 (barra central) y VSIG9#1 (barra izquierda) mejoran significativamente (** p<0,05) el efecto letal de estas células en comparación con el anticuerpo de control mlG (barra derecha). Finalmente, se examinó la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de VSIG9#1 en células HepG2 hepatocelulares humanas marcadas con ^{35}S que se incubaron con mAb anti-EGFR (Erbitux®) y se agregaron a células NK que se preincubaron con mAb de control (barra izquierda) o con VSIG9#1 (barra derecha) en una proporción de 10:1 de células efectoras:células diana, respectivamente. (** p<0,0007). Como se muestra en la Figura 3D, VSIG9#1 es capaz

de mejorar el efecto letal.

[0152] Los resultados demuestran que los mAbs antihumanos probados VSIG9#1 y 258-CS1#4 son capaces de potenciar el efecto de destrucción en diferentes células diana y en una variedad de condiciones. Los mAbs evitan el efecto inhibidor del receptor TIGIT y, por lo tanto, son adecuados para su uso como agentes anticancerosos.

Ejemplo 5. Los anticuerpos #4 y VSIG9#1 bloquean la unión de TIGIT a PVR.

[0153] Para examinar la capacidad de los mAbs 258-CS1#4 y VSIG9#1 para bloquear la interacción de TIGIT con sus ligandos, se incubaron células HepG2 que expresan PVR, Nectin-2 y Nectin-3 con TIGIT-Fc o TIGIT- Fc después de la preincubación con mAb VSIG-9#1 (Figura 4A), o con mAb 258-CS1#4 (Figura 4B). Los resultados mostraron que la preincubación de TIGITFc con VSIG-9 #1 bloqueó completamente la unión de TIGIT-Fc (Figura 4A), mientras que la preincubación con mAB 258-CS1#4 bloqueó parcialmente la unión de TIGIT-Fc (Figura 4B).

Ejemplo 6. Los anticuerpos 258-CS1#4 y VSIG-9#1 exhiben una alta y excepcional afinidad por TIGIT.

[0154] Se llevaron a cabo análisis cinéticos de unión completa de los mAbs a TIGIT humana de dos fuentes utilizando Biacore. Los resultados que se muestran en las Figuras 5A y 5B indican que los dos mAb muestran una gran afinidad por la TIGIT humana. Mientras que el mAb denominado 258-CS1#4 (#4) tenía un Kd promedio de aproximadamente 1×10^{-7} M (promedio de $9,96 \times 10^{-8}$ M y $1,07 \times 10^{-7}$ M), el mAb VSIG- 9#1 se une TIGIT humana con una afinidad extremadamente alta, con una Kd de $4,5 \times 10^{-10}$ M (promedio de $5,13^{-10}$ M y $3,87^{-10}$ M).

[0155] Se demostró además que mAb VSIG-9#1 es específico para TIGIT humana y no se une a TIGIT de ratón.

Ejemplo 7. El anticuerpo VSIG9#1 exhibe mayor afinidad por TIGIT en comparación con el anticuerpo comercial MBSA43.

[0156] Se comparó la afinidad de unión de los anticuerpos VSIG9 #1 y MBSA43 a TIGIT. Se tiñeron 75×10^3 células YTS que expresan TIGIT con los dos anticuerpos a concentraciones de dilución en serie de 250 nM a 65 fM, después de la determinación por FACS. Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, VSIG#9 tiñó las células a una concentración inferior a 62,5 fM, mientras que MBSA43 tiñó las células solo por encima de 1950 fM (1,95 pM) y no mostró tinción en las últimas 4 diluciones. Claras diferencias de tinción entre las se ven dos anticuerpos hasta una concentración de 250 pM. La superioridad del anticuerpo VSIG9#1 en comparación con el anticuerpo MBSA43 también se representa en la Figura 6B.

Ejemplo 8. La actividad bloqueante de VSIG9#1 es superior a la del anticuerpo comercial MBSA43.

[0157] Para examinar el efecto de bloqueo de anticuerpos anti-TIGIT sobre la unión de PVR-TIGIT, se realizó un ensayo de tinción de células YTS que expresan TIGIT con PVR-Fc. Se incubaron 75×10^3 células YTS-TIGIT con 2,5 pmoles de PVR-Fc en presencia de VSIG9#1 o MBSA43 en un intervalo de concentración de 27 a 0,014 pmoles en una serie de diluciones dobles.

[0158] Como se muestra en la Figura 7A (detección de PVR unido) y 7B (detección de mAb anti TIGIT unido), la actividad de bloqueo de PVR-TIGIT de VSIG9#1 fue significativamente mayor en comparación con MBSA43.

[0159] Los resultados de los Ejemplos 7 y 8 demuestran que VSIG9#1 tiene una afinidad significativamente mayor por TIGIT humana, en comparación con MBSA43 y que es significativamente mejor para prevenir la unión del ligando de alta afinidad (PVR) en un rango de concentraciones.

Ejemplo 9. Actividad sinérgica de mAb anti TIGIT con otros inhibidores de moléculas de puntos de control

[0160] Se examinó la eficacia de mAb VSIG9#1 (Vsig9.01), solo o en combinación con otros inmunomoduladores, en la inducción de la proliferación de células T mediante el bloqueo de TIGIT. Las PBMC de donantes sanos se marcaron con 5(6)-carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimidil éster (CFSE) y se activaron con anticuerpos anti-CD3 seguido de incubación durante 5-9 días con células MDA-MB-231 que sobreexpresan hCD80 en presencia de 4 µg/ml del mAb VSIG9#1, anti-PD-1 (Keytruda) y anti-CTLA4 (pilimumab), solos o combinados. La proliferación se midió mediante diluciones CFSE.

[0161] Los resultados que se muestran en la Figura 8, recopilados de al menos 5 experimentos diferentes, indican una sinergia entre el mAb anti TIGIT y anti PD-1 o anti CTLA4, demostrada por un aumento significativo de la proliferación de células T para la combinación de VSIG9#1 con los otros anticuerpos de punto de control ($*p<0,04$ $**<0,015$ $***<0,0004$).

Ejemplo 10. Efecto in vivo de los anticuerpos anti-TIGIT humanizados en un modelo de ratón de tumor humano

[0162] La eficacia antitumoral de los anticuerpos se estudia in vivo. Para estimar la eficacia de los anticuerpos descritos en el presente documento en la inhibición del cáncer humano, el anticuerpo se estudia en un modelo que combina tanto tumores como linfocitos de origen humano. Los ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) se injertan con

hPBL para restaurar la competencia inmunológica. Los ratones se exponen a células cancerosas humanas y se tratan con concentraciones crecientes del anticuerpo TIGIT antihumano, administrado en dosis única o multiintravascular varios días después de la exposición al tumor.

- 5 [0163] Se realiza un modelo similar con líneas tumorales en ratones SCID según Paine-Murrieta GD, Cancer Chemother Pharmacol. 1997;40(3):209-14.

Ejemplo 11. Inhibición del melanoma humano (SK-28) en ratones SCID por los anticuerpos anti-TIGIT humanizados

- 10 [0164] Para estimar la eficacia de los anticuerpos anti-TIGIT en la inhibición del cáncer humano, el anticuerpo modificado se estudia en un modelo que combina ambos tumores y linfocitos de origen humano. Los ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) se injertan con hPBL para restaurar la competencia inmunológica. Los ratones se exponen a células de melanoma humano (SK-28) y se tratan con concentraciones crecientes del anticuerpo, administrado en una sola dosis i.v. el día 11 después de la inyección del tumor.

- 15 [0165] De manera similar, un modelo descrito por Hardy et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1997 Mayo 27; 94(11): 5756-5760.

20 **Ejemplo 12. Inmunoterapia de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal humano mediante mAbs anti-TIGIT en ratones desnudos**

- 25 [0166] LIM6 y HM7 son dos subclones de la línea celular CRC humana LS174T que se seleccionaron por su alta síntesis de mucina y potencial metastásico. Las células tumorales se inyectan en el bazo expuesto de ratones desnudos anestesiados. Después de varios minutos, se extraen los bazos y se cierran las escisiones. Se administran dosis bajas de anticuerpos anti-TIGIT de la invención 10 días después y los ratones se sacrifican 35 días después de la inoculación del tumor. Se pesan los hígados, se cuenta el número de nódulos metastásicos y se procesa el tejido hepático para estudio histológico e inmunohistoquímico.

- 30 [0167] Modelos de metástasis adicionales que pueden usarse para probar los anticuerpos y fragmentos de la presente invención fueron descritos por Yung et al., Ocul Oncol Pathol. 2015 abril; 1(3): 151-160.

Ejemplo 13. Los anticuerpos anti TIGIT tienen un efecto sinérgico sobre las células de LMA

- 35 [0168] Se obtuvo un aspirado de médula ósea de un paciente con LMA, después de la separación con Ficoll, las células inmunitarias y los blastos se cocultivaron con varios anticuerpos (a 4 µg/ml) para 12 días después de 12 días se estableció la cantidad de células T.

- 40 [0169] Como se demuestra en la Figura 9, se observó un aumento significativo en la cantidad de células T CD8 en presencia de mAb anti-TIGIT VSIG9#1. Curiosamente, el bloqueo de TIGIT tuvo un efecto sinérgico con el bloqueo de PD-1 y CTLA-4.

LISTA DE SECUENCIAS

45 **[0170]**

<110> Yissum Research Development Company de la Hebrew University of Jerusalem Ltd. Facultad de Medicina de la Universidad de Rijeka

50 <120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA INMUNOGLOBULINA DE CÉLULAS T HUMANAS Y EL DOMINIO ITIM (TIGIT)

<130> YISSUM/0124 PCT

55 <150> 62/213140 <151> 2015-09-02

<150> 62/314427 <151> 2016-03-29

<160> 21

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

65 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 924 071 T3

<400> 1

5 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 2

15 Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

25 Lys Gly Pro Tyr Tyr Thr Lys Asn Glu Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

35 Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 5

40 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

45 Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp
1 5

50 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

55 <400> 6

Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Arg Thr
1 5

60 <210> 7

<211> 120

<212> PRT

65 <213> Mus musculus

<400> 7

ES 2 924 071 T3

5

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

10

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

15

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

20

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

25

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30

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

Ala Arg Lys Gly Pro Tyr Tyr Thr Lys Asn Glu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35

Gly Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser
115 120

40

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

45

50

55

60

65

ES 2 924 071 T3

	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15	
5	Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Tyr Ser			
	20	25	30	
10	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile			
	35	40	45	
15	Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
20	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Met Lys Ile Asn Ser Met Gln Pro			
	65	70	75	80
25	Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Arg			
	85	90	95	
30	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
	100	105	110	
35	Pro Thr Val Ser			
	115			
40	<210> 9			
	<211> 360			
	<212> ADN			
	<213> Mus Musculus			
45	<400> 9			
50	caggtgcagc tgcaggagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg	60		
	tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agctatggta taagctgggt gaagcagaga	120		
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatccca gaagtggtaa tacttactac	180		
	aatgagaagt tcaaggggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac	240		
	atggagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaaggga	300		
	ccctactata ctaagaacga ggactactgg ggccaaggca ccatttcac agtctcctca	360		
55	<210> 10			
	<211> 348			
	<212> ADN			
	<213> Mus musculus			
60	<400> 10			
65				

ES 2 924 071 T3

	gacatccaga tgactcagtc tccagacctcc ctggctgcat ctgtgggaga aactgtcacc	60
5	atcacatgtc gagcaagtga gcacatttac tacagtttag catggtatca gcagaagcaa	120
	gggaaatctc ctcagctcct gatctataat gcaaacagct tggaaagatgg tgtccccatcg	180
	aggttcagtg gcagtggatc tgggacacaa tattctatga agatcaacag catgcagcct	240
10	gaagataaccg caacttattt ctgtaaacag gcttatgacg ttccctcggac cttcggtgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatcc	348
15	<210> 11	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
20	<400> 11	
	Thr Ser Tyr Gly Ile Ser 1 5	
25	<210> 12	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
30	<400> 12	
	Ile Tyr Cys Ile His 1 5	
35	<210> 13	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
40	<400> 13	
	Glu Ile Ser Pro Ser Asn Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys 1 5 10 15	
45	Asn	
	<210> 14	
50	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
	<400> 14	
55	Ser Asp Gly Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
	1 5 10	
60	<210> 15	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
65	<400> 15	

ES 2 924 071 T3

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Asn
1 5 10

5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 16

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

15

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

20

<213> Mus musculus

<400> 17

Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

25

<210> 18

<211> 120

30

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 924 071 T3

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

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

10 Cys Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

15 Gly Glu Ile Ser Pro Ser Asn Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

20 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

30 Ala Ile Ser Asp Gly Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

35 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

40 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

50 Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

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

65 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

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

ES 2 924 071 T3

	<210> 20	
	<211> 360	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
5		
	<400> 20	
	caggtccaac tgctgcagcc tggggctgaa ctggtaagc ctggggcttc agtgaagctg	60
10	tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc atctactgta tacactgggt gaagcagagg	120
	cctggacaag gccttgagtg gattggagag attagtccta gcaacggtcg tactatctac	180
15	aatgagaagt tcaagaacaa ggcccacactg actatacgaca aatcctccac cacagcctac	240
	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcgtct attgctgtgc aatatcgat	300
20	ggttacgacg gatactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	360
	<210> 21	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
25		
	<400> 21	
	gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctctggaga aagagtcagt	60
30	ctcaacttgc gggcaagtca ggaaattagt gttacttaa actggcttca gcagaaacca	120
	gatggaacta taaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa	180
35	aggttcagtg gcagtagggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag acttgagtct	240
	gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatgcttagtt atcctcgac gttcggtgga	300
	ggcaccaagc tgaaaaatcaa a	321

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento se une a inmunoglobulina de células T humanas y dominio ITIM (TIGIT) y es capaz de inhibir la unión de TIGIT a al menos PVR (CD 155), donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
- (i) una cadena pesada que comprende un HCDR1 como se establece en SEQ ID NO: 1 u 11; HCDR2 como se establece en SEQ ID NO: 2; HCDR3 como se establece en SEQ ID NO: 3; y
- (ii) una cadena ligera que comprende un LCDR1 como se establece en SEQ ID NO: 4; LCDR2 como se establece en SEQ ID NO: 5; y LCDR3 como se establece en SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 7 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 8.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el anticuerpo está humanizado.
4. Un anticuerpo biespecífico que comprende dos conjuntos de CDR, en el que uno de los conjuntos comprende las CDR como se define en la reivindicación 1.
5. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 4, en el que el segundo conjunto de CDR comprende HCDR1 como se establece en SEQ ID NO: 12; HCDR2 como se establece en SEQ ID NO: 13, HCDR3 como se establece en SEQ ID NO: 14; LCDR1 como se establece en SEQ ID NO: 15; LCDR2 como se establece en SEQ ID NO: 16; y LCDR3 como se establece en SEQ ID NO: 17.
6. Un conjugado de anticuerpo que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
7. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo está conjugado con un resto citotóxico, radiactivo o identificable.
8. Una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en la que dicho polinucleótido comprende SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
9. Un vector que comprende una secuencia polinucleotídica según la reivindicación 8.
10. Una célula de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1.
11. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo, al menos un anticuerpo aislado o fragmento del mismo según cualquiera de reivindicaciones 1 a 7, y un excipiente, diluyente, sal o vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para uso en el tratamiento del cáncer.
13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12,
- que comprende además una terapia anticancerígena adicional seleccionada de cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia; o
- que comprende además administrar una molécula de punto de control inmunitario seleccionada del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, PDL-1, CEACAM1, gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), CD137, OX40 (también denominado CD134), inmunoglobulina de células asesinas -receptores similares (KIR), y cualquier combinación de los mismos, preferiblemente en donde la terapia contra el cáncer comprende la administración de un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
14. Un método para determinar o cuantificar la expresión de TIGIT, comprendiendo el método poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y medir el nivel de formación de complejos.
15. Un kit para medir la expresión de TIGIT en muestra biológica que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

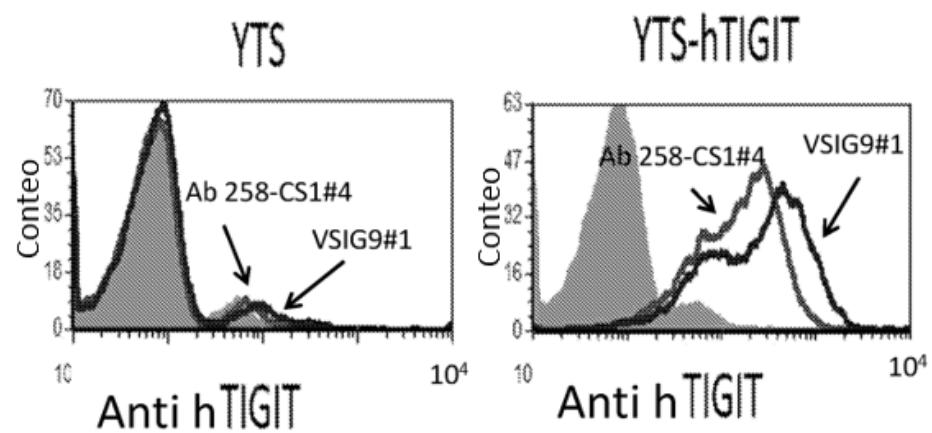


FIGURA 1A

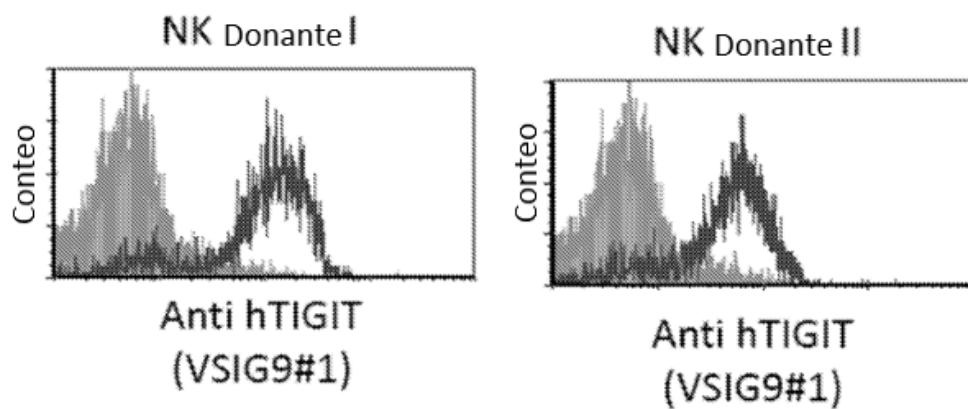


FIGURA 1B

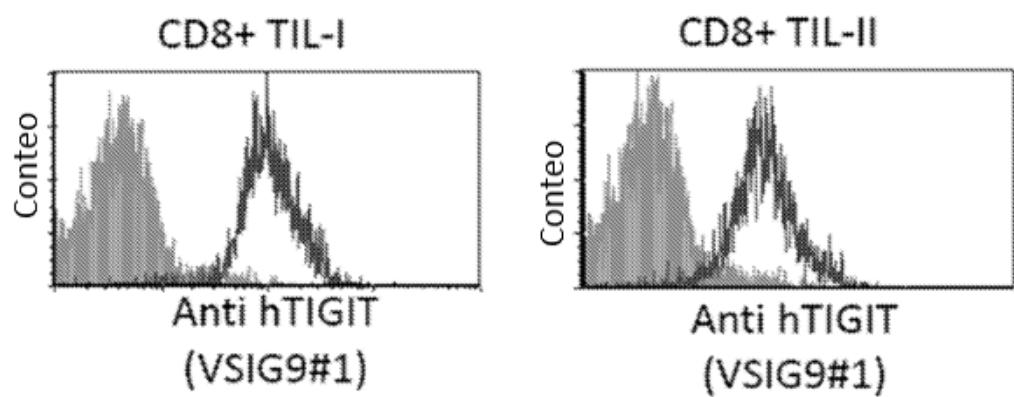


FIGURA 1C

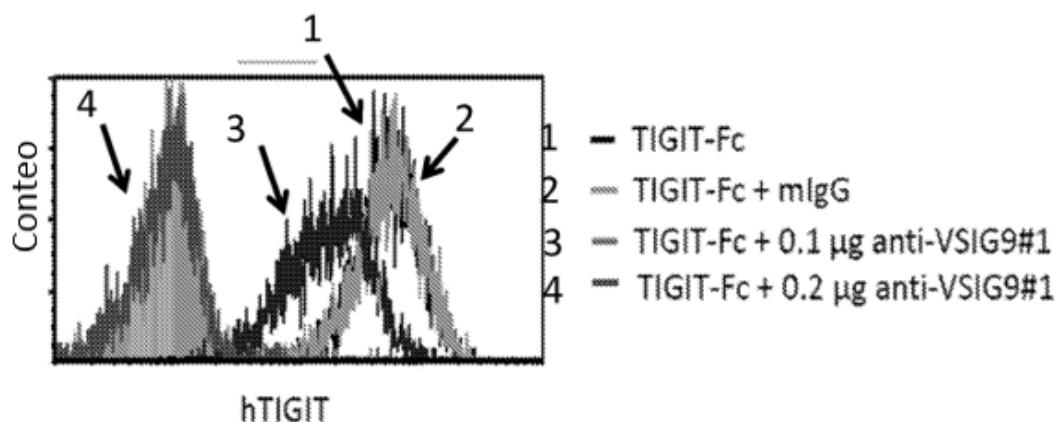


FIGURA 2A

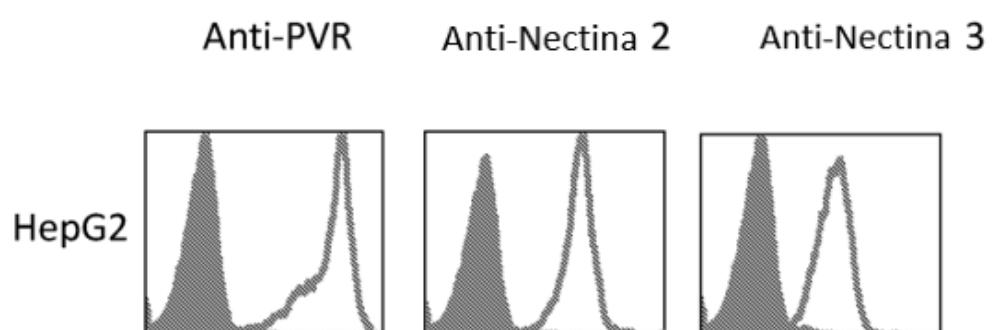


FIGURA 2B

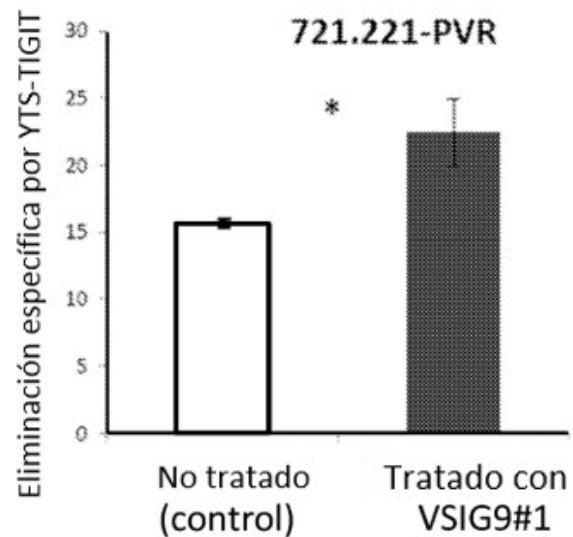


FIGURA 3A

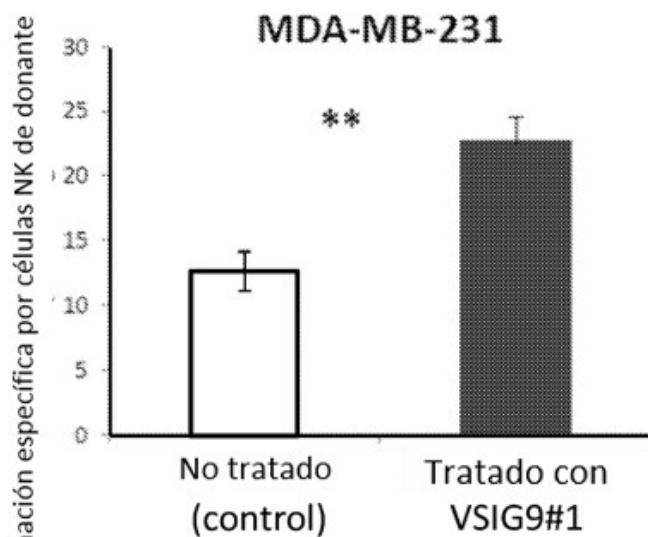


FIGURA 3B

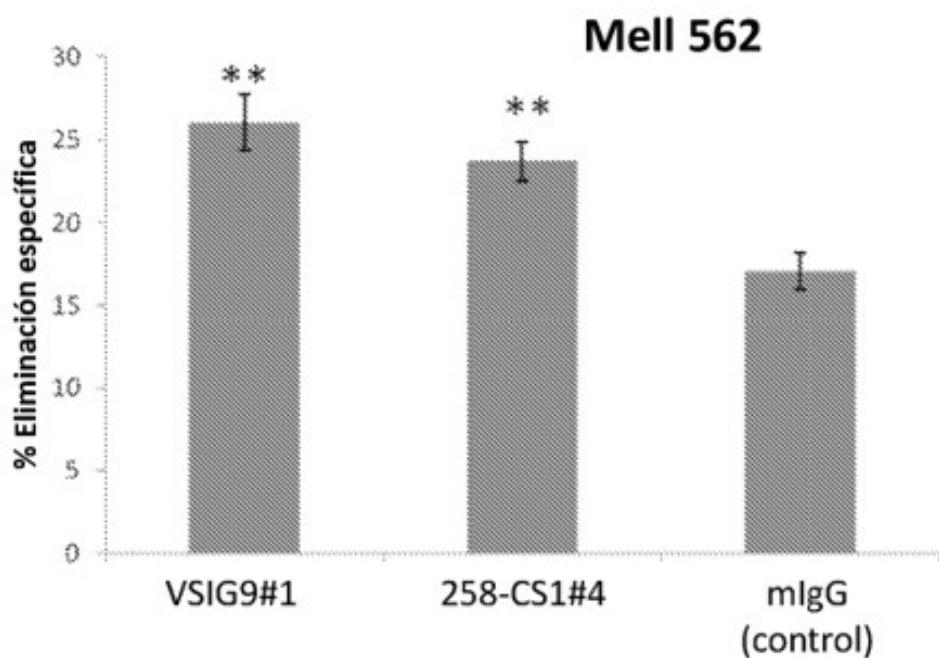


FIGURA 3C

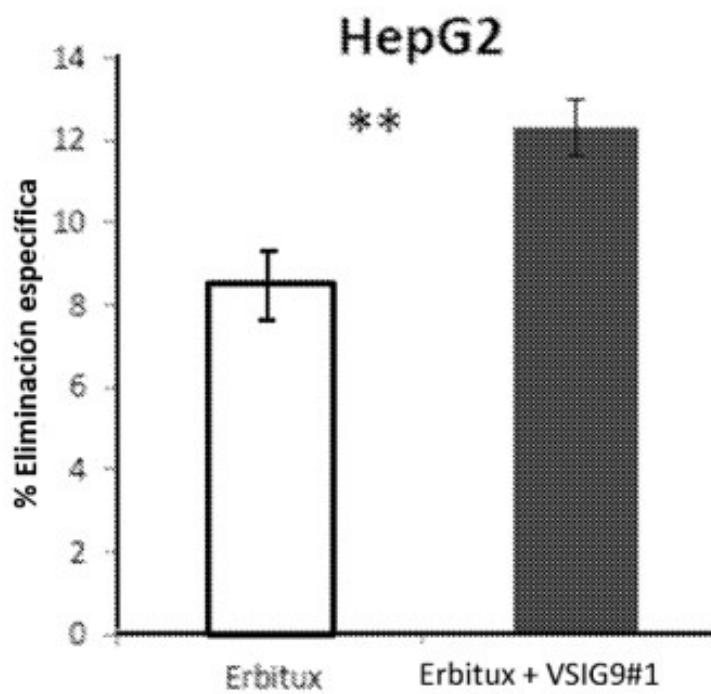


FIGURA 3D

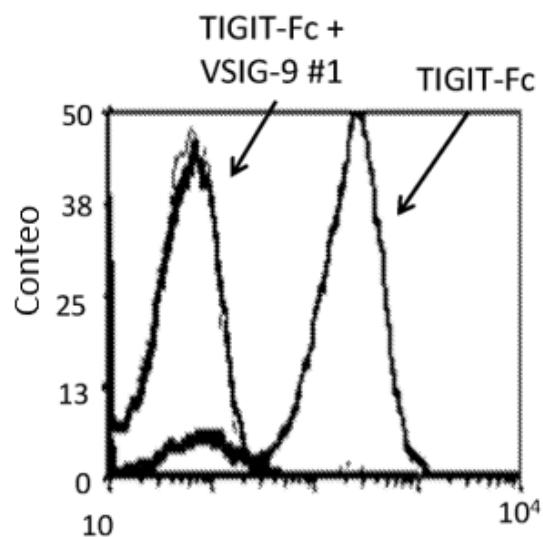


FIGURA 4A

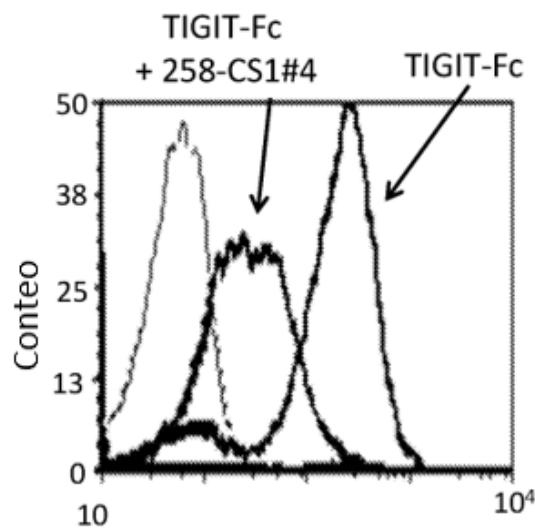


FIGURA 4B

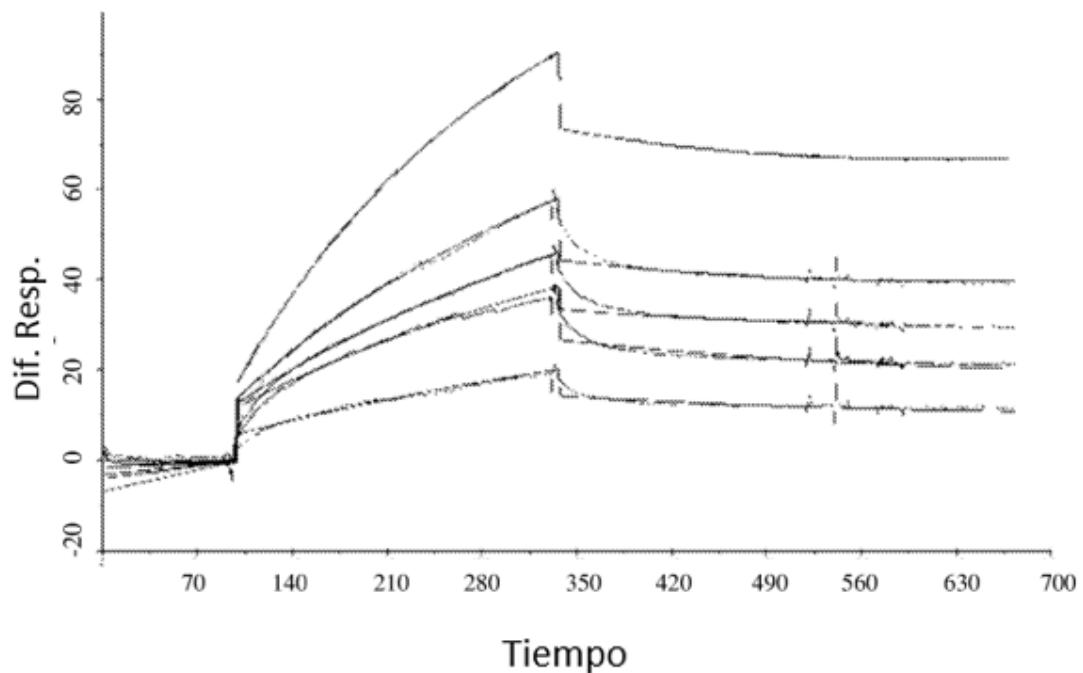


FIGURA 5A

ES 2 924 071 T3

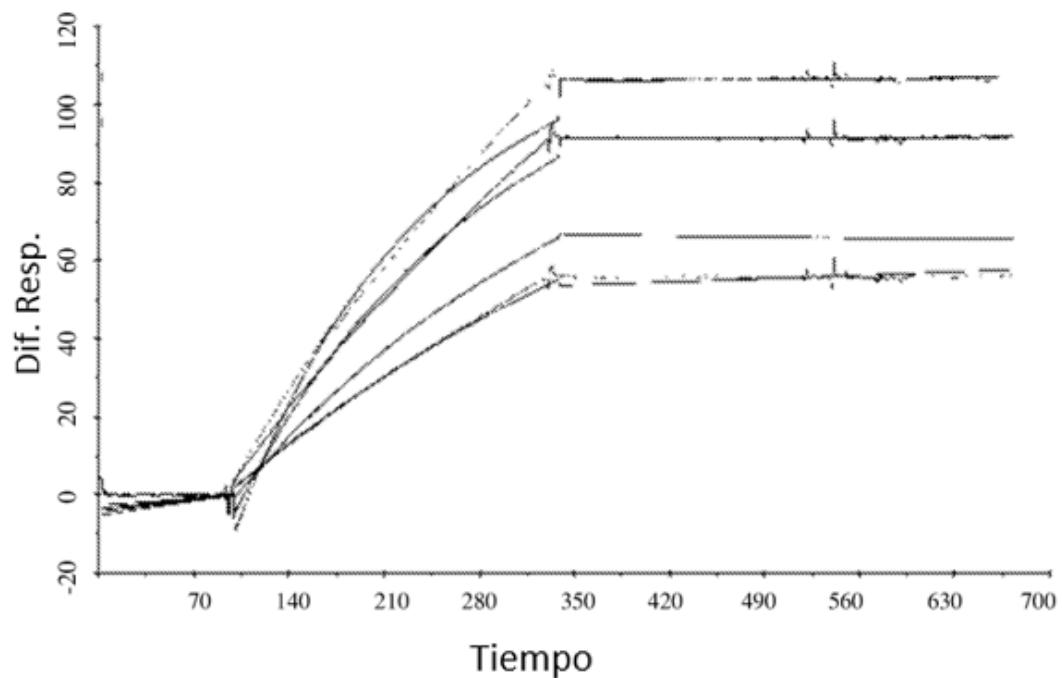


FIGURA 5B

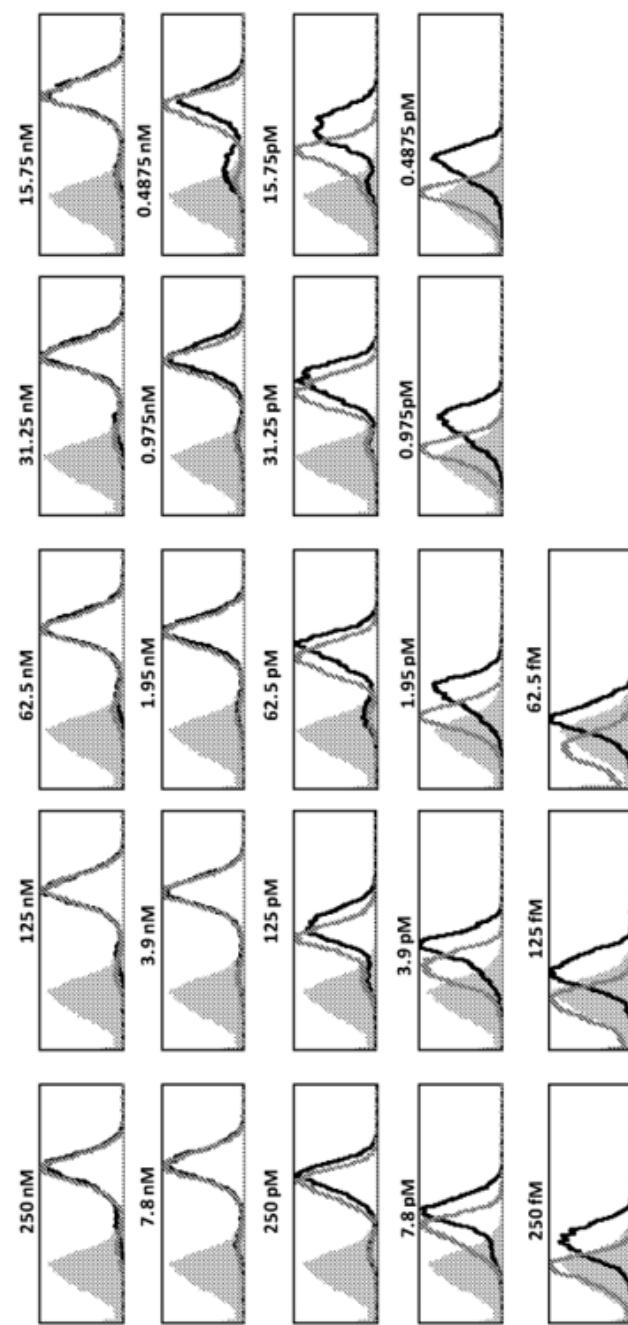


FIGURA 6A

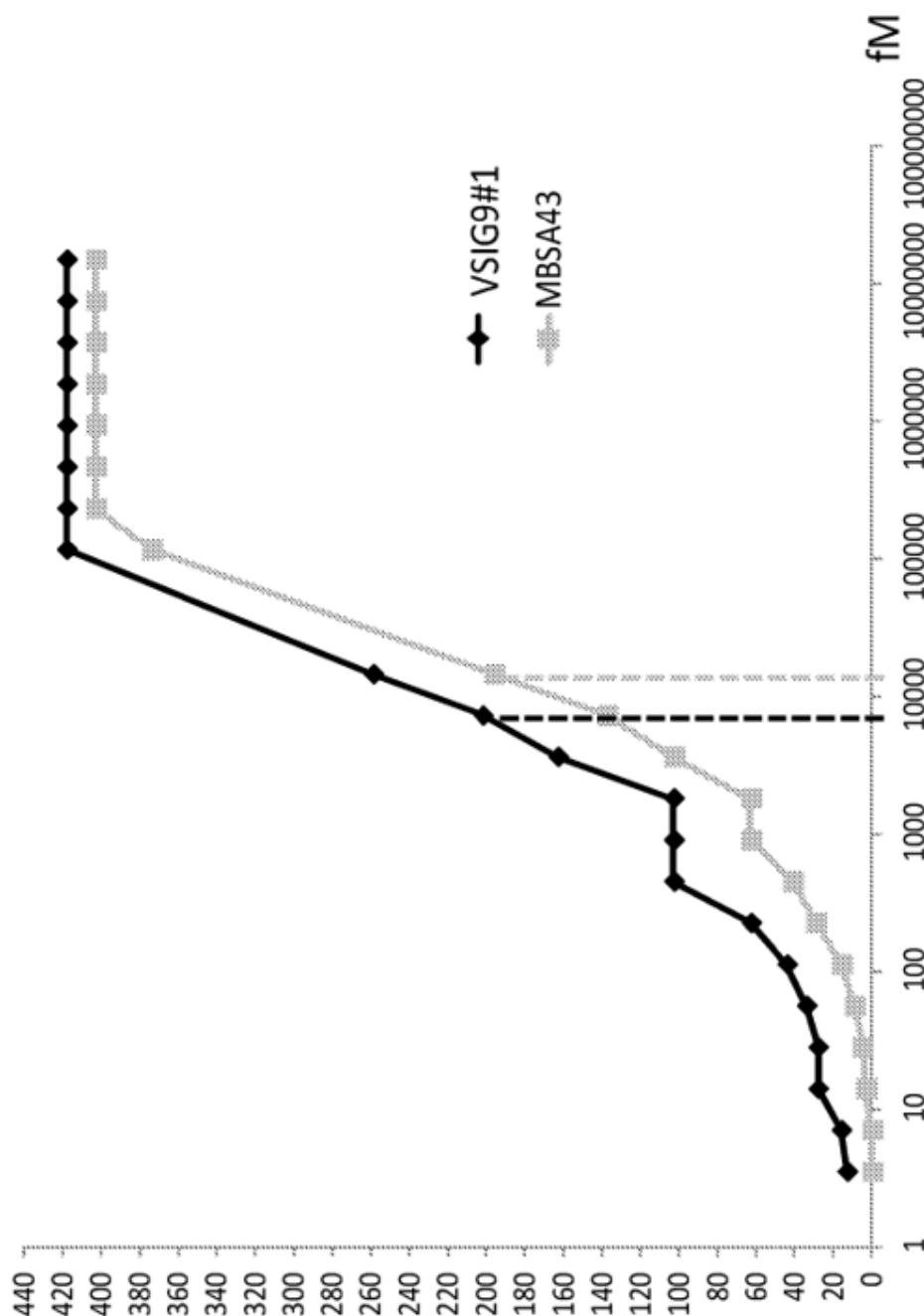


FIGURA 6B

ES 2 924 071 T3

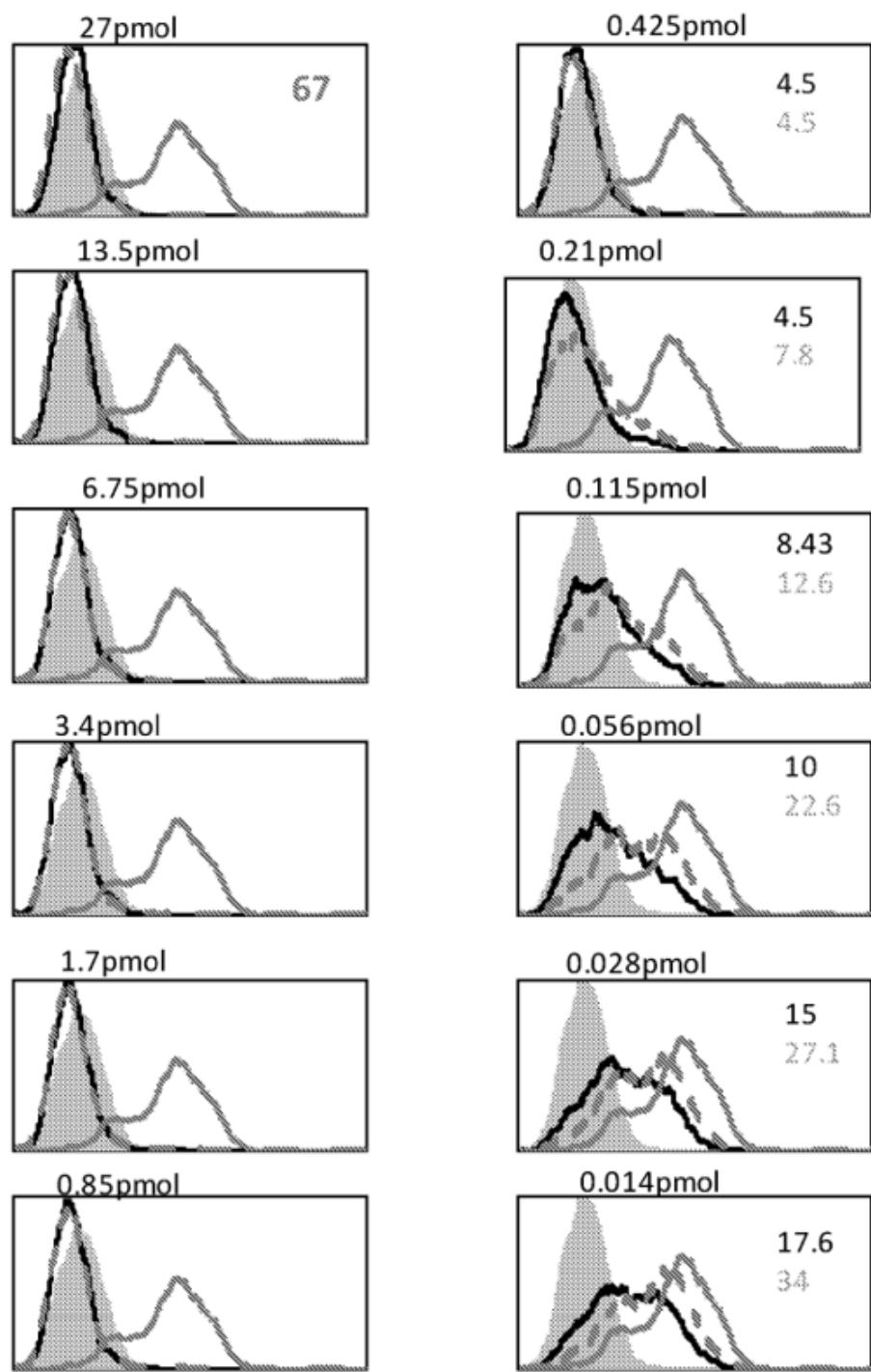


FIGURA 7A

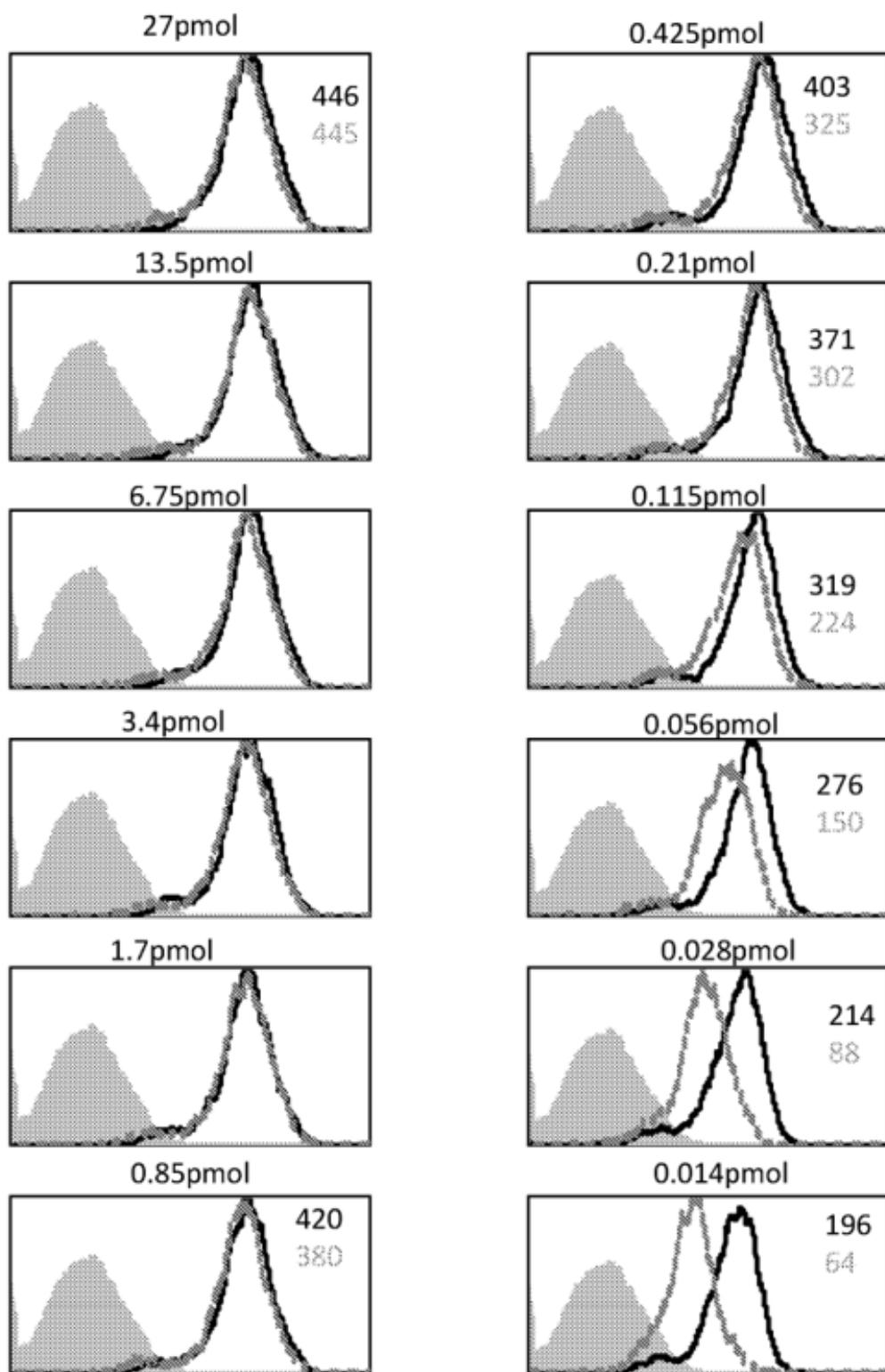


FIGURA 7B

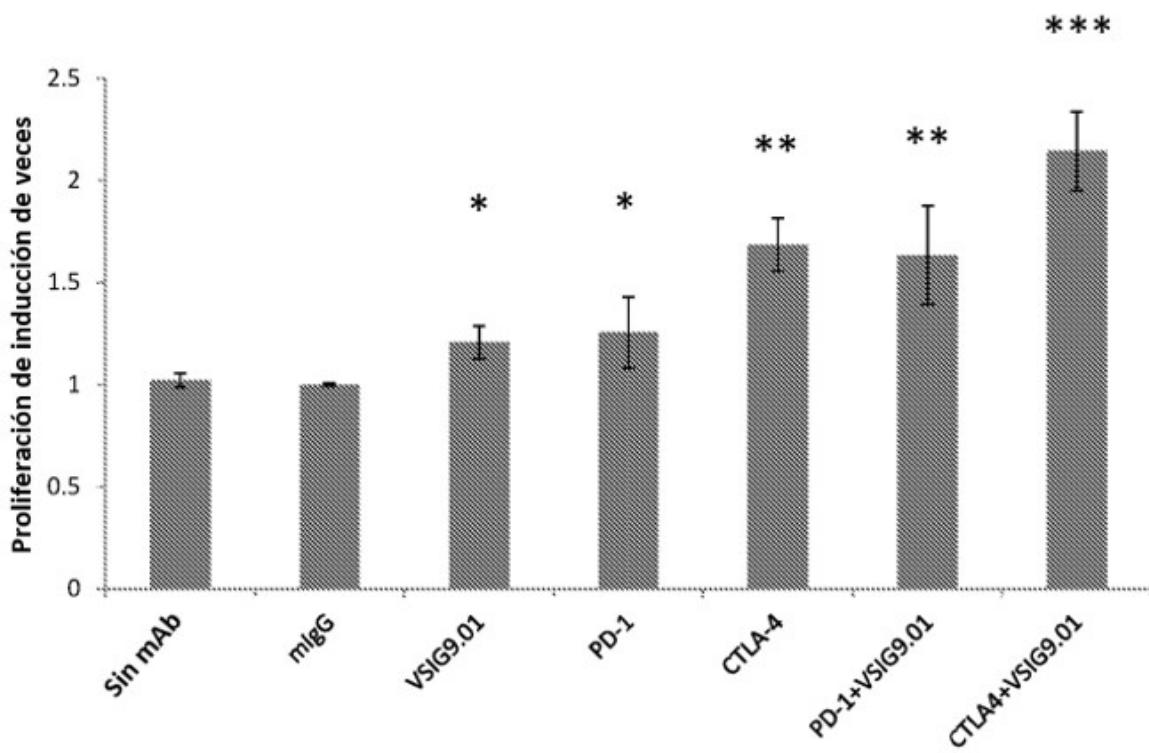


FIGURA 8

