



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 812 236**

⑮ Int. Cl.:

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

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2018 PCT/US2018/043968**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019 WO19023504**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2018 E 18750302 (4)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3484925**

⑮ Título: **Anticuerpos anti-TIGIT**

⑯ Prioridad:

27.07.2017 US 201762606159 P
31.07.2017 BE 201705535
31.07.2017 EP 17184102
20.04.2018 US 201862660640 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2021

⑯ Titular/es:

ITEOS BELGIUM SA (100.0%)
Rue des Frères Wright 29
6041 Gosselies, BE

⑯ Inventor/es:

COOPER, ANTHONY;
QUEVA, CHRISTOPHE;
DENIES, SOFIE;
HOOFD, CATHERINE;
CUENDE, JULIA;
DRIESSENS, GREGORY y
LAMBOLEZ, FLORENCE

⑯ Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 812 236 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 anti-TIGIT

5 **Antecedentes**

La inmunoterapia contra el cáncer se basa en la modulación del sistema inmunitario para aumentar el reconocimiento y respuesta contra células tumorales. Dicha modulación puede conseguirse mediante múltiples mecanismos, incluyendo la activación de moléculas coestimuladoras presentes en los inmunocitos o a través de la inhibición de receptores coinhididores. La activación de una respuesta inmunitaria es un mecanismo complejo que implica numerosas poblaciones celulares como células presentadoras de antígeno importantes para el inicio de la respuesta específica de antígeno y células efectoras responsables de la destrucción de células tumorales. Los mecanismos que modulan la actividad de células efectoras como linfocitos T citotóxicos son numerosos representan la diana de elección en el contexto de inmunoterapia contra el cáncer.

10 TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), también denominado WUCAM, VSIG9 o Vstm3, es un receptor coinhididor expresado preferentemente en linfocitos NK, T CD8+ y CD4+, así como en linfocitos T reguladores (linfocitos Treg o simplemente "Treg"). TIGIT es una proteína transmembranaria que contiene un dominio ITIM conocido en su parte intracelular, un dominio transmembranario y un dominio variable de inmunoglobulina en la parte extracelular del receptor. Se describieron varios ligandos que se unen al receptor TIGIT, mostrando CD155/PVR la mejor afinidad seguido de CD113/PVRL3 y CD112/PVRL2 (Yu *et al.* (2009) *Nat. Immunol.* 10:48.). DNAM/CD226, un receptor coestimulador conocido también expresado en linfocitos NK y T compite con TIGIT por la unión a CD155 y CD112, pero con una menor afinidad, lo que sugiere un estrecho control de la activación de estas células efectoras para evitar una citotoxicidad incontrolada contra células normales que expresan el ligando CD155.

15 La expresión de TIGIT está aumentada en linfocitos de infiltración tumoral (TIL) y en entorno de enfermedad tales como infección por VIH. La expresión de TIGIT marca los linfocitos T agotados que tienen menor función efectora en comparación con equivalentes negativos para TIGIT (Kurtulus *et al.* (2015) *J.Clin.Invest.* 276:112; Chew *et al.* (2016) *Plos Pathogens.* 12). En cambio, los linfocitos Treg que expresan TIGIT muestran actividad inmunosupresora potenciada en comparación con una población Treg negativa para TIGIT (Joller *et al.* (2014) *Immunity.* 40:569).

20 Como otros receptores coinhididores (PD1 o CTLA4) expresados en linfocitos T que se ha demostrado que son diana relevante para inmunoterapia y para los que se han aprobado anticuerpos antagonistas para el tratamiento de cáncer humano, el desarrollo de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT puede ayudar a activar el sistema inmunitario y combatir mejor a las células cancerosas. Se ha sugerido que los anticuerpos antagonistas anti-TIGIT en monoterapia o en combinación con anticuerpos a-PD1 podrían conseguir fuerte eficacia antitumoral en modelos preclínicos (Johnston *et al.* (2014) *Cancer Cell* 26:1; documento WO2016/028656; documento US2016/0176963; documento US2016/0376365).

25 40 Por tanto, los anticuerpos antagonistas específicos para TIGIT que podrían inhibir la actividad del receptor TIGIT representan una oportunidad para disminuir el efecto inmunosupresor asociado con microentornos tumorales y, de ese modo, aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral contra las células tumorales.

45 **Sumario de la invención**

La invención es como se define en las reivindicaciones.

50 La presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que pueden disminuir el efecto inmunosupresor de la señalización mediada por TIGIT. En particular, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención pueden inhibir la inmunosupresión mediada por TIGIT al evitar la unión del ligando en linfocitos T (linfocitos T αβ convencionales y linfocitos T γδ no convencionales) y linfocitos NK y/o reducción de linfocitos Treg positivos para TIGIT, y/o induciendo la internalización del receptor TIGIT.

55 65 En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TIGIT humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:

HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16 (YTFITSYYMH),
 HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
 HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
 LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
 LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), and
 LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63 (QQYFSPPWT).

65 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de acuerdo

con la invención, que comprende una combinación de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 221 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 222 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.

5 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención, que comprende una combinación de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 219 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 220 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.

10 15 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno más preferidos proporcionados en el presente documento son los basados en las CDR o dominios variables completos del anticuerpo 31282 proporcionado en el presente documento.

20 Como se demuestra en el presente documento, estos anticuerpos anti-TIGIT y fragmentos de unión a antígeno preferidos basados en el anticuerpo 31282 tienen propiedades particularmente sorprendentes y ventajosas. Estas propiedades incluyen: una mayor afinidad por TIGIT expresado en linfocitos T CD8 (de donadores sanos o de pacientes con cáncer) en comparación con cada anticuerpos anti-TIGIT previamente descrito ensayado; una mejor Cl_{50} para la competición con CD155/PVR en comparación con cada anticuerpo anti-TIGIT descrito previamente ensayado; una mejor CE_{50} en ensayos de activación de linfocitos T en comparación con cada anticuerpos anti-TIGIT descrito previamente ensayado; y actividad que aumenta de forma potente en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer y, de forma importante, en linfocitos de infiltración tumoral. Además, se muestra sorprendentemente en el presente documento que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la invención, especialmente los basados en el anticuerpo 31282, preferentemente reducen los linfocitos Treg. Es decir, los linfocitos Treg que expresan TIGIT expuestos a los anticuerpos anti-TIGIT proporcionados experimentan 25 lisis a una mayor proporción en comparación con linfocitos T CD4 y CD8 convencionales. Esto es sorprendente porque los linfocitos T CD4 y CD8 convencionales también expresan TIGIT, pero no experimentan lisis celular al mismo grado cuando se ponen en contacto con los anticuerpos. Se muestra además sorprendentemente que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la invención, especialmente los basados en el anticuerpo 31282, no solo promueven la actividad proinflamatoria de linfocitos T convencionales, sino que también 30 35 aumentan la actividad de linfocitos T y/o convencionales.

En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-TIGIT es el anticuerpo 31282 descrito en el presente documento.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a TIGIT humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:

45 HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16 (YTFTSYYMH),
 HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
 HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWGIMEV),
 50 LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
 LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), and
 LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63 (QQYFSPPWT).

En un aspecto adicional, la invención proporciona un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo anti-TIGIT, en el que el polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados comprende la SEQ ID NO: 251 y la SEQ ID NO: 252.

60 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención para su uso en tratamiento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que el método comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En determinadas realizaciones preferidas, el uno o más agentes adicionales se seleccionan de: un agente quimioterápico, un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-GITR y un anticuerpo anti-ICOS.

En todos los aspectos relevantes, se prefiere que cualquier sujeto a tratar sea un sujeto humano. En todos los aspectos relevantes, se prefiere que las células (por ejemplo, linfocitos T) en contacto con anticuerpos de acuerdo con la invención sean células humanas (por ejemplo, linfocitos T humanos).

Salvo que sea técnicamente incompatible o se indique lo contrario, cualquier realización preferida descrita puede usarse opcionalmente en combinación con una o más de todas las otras realizaciones preferidas.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1** Tabla que proporciona secuencias de la región determinante de complementariedad (CDR) del dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpos de la invención
- Figura 2** Tabla que proporciona secuencias CDR del dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpos de la invención
- Figura 3** Tabla que proporciona secuencias flanqueantes (FR) del dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpos de la invención
- Figura 4** Tabla que proporciona secuencias flanqueantes (FR) del dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpos de la invención
- Figura 5** Tabla que proporciona secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpos de la invención
- Figura 6** Tabla que proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican dominios VH y VL de anticuerpos de acuerdo con la invención
- Figura 7** Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de competición entre hCD155 y anticuerpos anti-TIGIT por la unión a Jurkat-hTIGIT
- Figura 8** (A) Gráfico que muestra la proporción de células positivas para TIGIT dentro de poblaciones específicas de linfocitos T de PBMC de 7 donadores humanos sanos. (B) Gráfico que muestra la proporción de células positivas para TIGIT dentro de diferentes poblaciones inmunitarias de PBMC de 7 donadores humanos sanos.
- Figura 9** Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión de anticuerpo anti-TIGIT en Jurkat-hTIGIT
- Figura 10** (A y B) Gráficos que muestran los resultados de un ensayo de unión de anticuerpo anti-TIGIT en linfocitos T CD8+ primarios de PBMC sanos humanos. (C) Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión de anticuerpo anti-TIGIT en linfocitos T CD8+ de memoria primarios y Treg de PBMC sanos humanos
- Figura 11** Gráficos que muestran los resultados de un ensayo de unión de anticuerpo anti-TIGIT en linfocitos T CD8+ de PBMC sanos de macaco
- Figura 12** Gráficos que muestran el efecto de anticuerpos anti-TIGIT en un bioensayo de CHO-TCR-CD155 y Jurkat-hTIGIT
- Figura 13** Gráficos que muestran el efecto de anticuerpos anti-TIGIT para aumentar la secreción de IFNg en un ensayo funcional en linfocitos T CD8 primarios humanos de donadores sanos activados con células CHO-TCR-CD155
- Figura 14** Histogramas que muestran el efecto de anticuerpo anti-TIGIT para aumentar la secreción de IFNg en un ensayo funcional en TIL CD8+ primarios humanos de ascitis ovárica activados con células CHO-TCR-CD155
- Figura 15** (A) Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de competición entre CD155 de ratón y anticuerpos anti-TIGIT por la unión a Jurkat-mTIGIT. (B) Gráfico que muestra el efecto de anticuerpo anti-TIGIT para aumentar la secreción de IFNg en un ensayo funcional en linfocitos T OT-1 de ratón. (C) Gráfico que muestra el efecto de anticuerpo anti-TIGIT para aumentar la citotoxicidad en un ensayo funcional en linfocitos T OT-1 de ratón.
- Figura 16** (A) Gráfico que muestra la eficacia antitumoral de anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia en un modelo de tumor CT26. (B y C) Gráficos que muestran la eficacia antitumoral de anticuerpo anti-TIGIT en combinación con anti-PD1 en un modelo de tumor CT26.
- Figura 17** (A) Gráfico que muestra la eficacia antitumoral dependiente de isotipo de anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia en un modelo de tumor CT26. (B) Gráfico que muestra la eficacia antitumoral dependiente de isotipo de anticuerpo anti-TIGIT en combinación con anti-PD1 en un modelo de tumor CT26.

- Figura 18** (A y G) Gráficos que muestran la modulación de la proporción de linfocitos Treg dentro de la población de linfocitos T CD4+ total en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1. (B y H) Gráficos que muestran la modulación de la proporción de linfocitos T CD8+ dentro de la población CD45+ total en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1. (C e I) Gráficos que muestran la modulación de la relación de linfocitos T CD8+/Treg en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1. (D y J) Gráfico que muestra la modulación de linfocitos T CD4+ que secretan IFNg en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1. (E) Gráfico que muestra la modulación de linfocitos T CD8+ que secretan IFNg en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT. (L y F) Gráficos que muestran la relación de linfocitos T CD4+ que secretan IFNg/IL-10 en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1. (K) Gráfico que muestra la modulación de linfocitos T CD4+ que secretan IL-10 en tumor CT26 tratado por anticuerpo anti-TIGIT en combinación con anticuerpo anti-PD1.
- Figura 19** (A) Diagrama de volcán que muestra el efecto de tratamiento con anticuerpo anti-TIGIT para modular la expresión génica en tumor CT26 y medido por análisis NanoString. (B) Diagrama de cajas que muestra la modulación de la puntuación citotóxica en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1. (C) Diagrama de cajas que muestra la modulación de la puntuación de linfocitos T CD8+ en tumor CT26 tratado con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o combinación con anti-PD1
- Figura 20** (A) Histogramas que muestran la proporción de población de linfocitos T TIGIT+ CD4+, CD8+ y Treg en PBMC de voluntarios sanos humanos. (B) Gráfico que muestra el efecto de citotoxicidad *in vitro* de anticuerpo anti-TIGIT en poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y Treg convencionales en PBMC de voluntarios sanos humanos.
- Figura 21** Gráfico que muestra el efecto de citotoxicidad de anticuerpo anti-TIGIT en poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y Treg en tumor CT26.
- Figura 22** (A) Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión de clones de anticuerpo anti-TIGIT en células Jurkat-hTIGIT. (B) Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión de clones de anticuerpo anti-TIGIT en linfocitos T CD8+ primarios de PBMC humanos sanos. (C) Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión de clones de anticuerpo anti-TIGIT en linfocitos T CD8+ primarios de PBMC de pacientes con cáncer.
- Figura 23** Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de competición entre CD155 humano y clones de anticuerpo anti-TIGIT por la unión a Jurkat-hTIGIT
- Figura 24** Gráfico que muestra la caracterización funcional de clones antagonistas a-TIGIT. (A) Gráficos que muestran el efecto de anticuerpos anti-TIGIT en un ensayo funcional usando células efectoras Jurkat-hTIGIT (ensayo indicador de luciferasa). (B) Gráficos que muestran el efecto de anticuerpos anti-TIGIT en un ensayo funcional que mide la secreción de IFNg por linfocitos T CD8+ primarios humanos de voluntarios sanos. (C) Gráfico que muestra el efecto del clon 31282 de anticuerpo anti-TIGIT en ensayo funcional que mide la secreción de IFNg por linfocitos T CD3+ de pacientes con cáncer de PBMC. (D) Gráfico que muestra el efecto del clon 31282 de anticuerpo anti-TIGIT en ensayo funcional que mide la tinción de citocinas intracelulares en TIL de paciente con cáncer o PBMC.
- Figura 25** Actividad citotóxica del clon 31282 a-TIGIT sobre poblaciones totales de linfocitos T CD4+ o CD8+ de memoria y Treg en PBMC de paciente con cáncer
- Figura 26** Gráfico que muestra la caracterización de expresión de TIGIT en poblaciones inmunitarias de pacientes con cáncer. (A) Frecuencia de expresión de TIGIT sobre poblaciones inmunitarias de PBMC y TIL de paciente con cáncer. (B) Cuantificación absoluta de la expresión de TIGIT sobre poblaciones inmunitarias de PBMC y TIL de paciente con cáncer.
- Figura 27** (A) Estructura de complejo de Fab:TIGIT mostrado como diagrama de cintas; (B) Superficie de contacto de unión completa entre el clon 31282 y TIGIT; (C) Superficie de contacto de unión entre el clon 31282 y TIGIT que muestra residuos en contacto.
- Figura 28** Ensayo de competición entre los clones 31282 y 32959 anti-TIGIT.
- Figura 29** Medida de concentración plasmática del clon 31282 anti-TIGIT después de inyección i.v. De una sola dosis a 0,1 mg/kg (fila superior), 1 mg/kg (fila intermedia) o 10 mg/kg (fila inferior) en macaco cangrejero. Columna de la izquierda: IgG1 31282; columna de la derecha IgG4 31282.
- Figura 30** Gráfico que muestra la caracterización de la expresión de TIGIT sobre poblaciones de linfocitos T CD4+ malignas y normales de paciente con síndrome de Sézary. (A) Estrategia de selección para separar linfocitos T CD4+ malignos y normales. (B) MFI para la tinción de TIGIT en las 2 poblaciones distintas.
- Figura 31** Gráfico que muestra la caracterización de la expresión de TIGIT sobre poblaciones de linfocitos B malignas y normales de paciente con CLL. (A) Estrategia de selección para separar linfocitos B malignos y normales. (B) MFI para la tinción de TIGIT en las 2 poblaciones distintas.

Figura 32 (A-C) Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados con tumores EL4-mTIGIT. (A) Curvas de la mediana de crecimiento tumoral. (B) Curvas de crecimiento tumoral individuales en ratones tratados con anticuerpos de control de isotipo hlgG1. (C) Curvas de crecimiento tumoral individuales en ratones tratados con anticuerpo antagonista a-TIGIT equivalente de ratón (hlgG1). (D-F) Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados con tumores EL4-GFP. (D) Curvas de la mediana de crecimiento tumoral. (E) Curvas de crecimiento tumoral individuales en ratones tratados con anticuerpos de control de isotipo hlgG1. (F) Curvas de crecimiento tumoral individuales en ratones tratados con antagonista a-TIGIT equivalente (hlgG1).

Figura 33 (A-D) Gráficos que muestran las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados con tumores CT26. (A) Curvas de la mediana de crecimiento tumoral y curvas de crecimiento tumoral individuales para ratones tratados con anticuerpos anti-TIGIT y anti-4-1BB. (B) Curvas de la mediana de crecimiento tumoral y curvas de crecimiento tumoral individuales para ratones tratados con anticuerpos anti-TIGIT y anti-OX-40. (C) Curvas de la mediana de crecimiento tumoral y curvas de crecimiento tumoral individuales para ratones tratados con anticuerpos anti-TIGIT y anti-GITR. (D) Curvas de la mediana de crecimiento tumoral y curvas de crecimiento tumoral individuales para ratones tratados con anticuerpos anti-TIGIT y anti-ICOS.

Figura 34 Gráficos que muestran el efecto de anticuerpos anti-TIGIT sobre linfocitos T $\gamma\delta$. (A) Mediana de la proporción de células positivas para TIGIT y señal MFI para TIGIT dentro de poblaciones de linfocitos T $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ de PBMC de donadores humanos positivos y negativos para CMV. (B) Gráfico que muestra la actividad de Ab anti-TIGIT para aumentar la secreción de IFNg en un ensayo funcional sobre linfocitos T $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ primarios humanos aislados. (C) Gráfico que muestra la actividad de Ab anti-TIGIT para aumentar la secreción de IFNg en un ensayo funcional sobre PBMC totales.

Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

5 Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" incluye un polipéptido que tiene una combinación de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras posea o no alguna inmunorreactividad específica relevante. "Anticuerpos" se refiere a dichos ensamblajes que tienen actividad inmunorreactiva específica conocida significativa contra un antígeno de interés (por ejemplo, TIGIT). La expresión "anticuerpos contra TIGIT" o "anticuerpos anti-TIGIT" se usa en el presente documento para hacer referencia a anticuerpos que muestran 10 especificidad inmunológica por la proteína TIGIT. Los anticuerpos e inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellas. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados están relativamente bien comprendidas.

15 El término genérico "inmunoglobulina" comprende cinco clases distintas de anticuerpo que pueden distinguirse bioquímicamente. Aunque las cinco clases de anticuerpos están dentro del alcance de la presente invención, el siguiente análisis se referirá, en líneas generales, a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas polipeptídicas ligera idénticas de peso molecular de aproximadamente 23 000 daltons, y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular 53 000-70 000. Las cuatro 20 cadenas se unen mediante enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligera soportan las cadenas pesadas comenzando en la boca de la configuración en "Y" y continuando a través de la región variable.

25 Las cadenas ligera de un anticuerpo se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o con una cadena ligera lambda. En general, las cadenas ligera y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las partes de la "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando se generan las inmunoglobulinas por linfocitos B o células hospedadoras genomanipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos discurren desde un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración en Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). La naturaleza de esta 30 cadena es lo que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y son conocidas por conferir especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por los expertos en la materia en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención.

35 Como se indica anteriormente, la región variable de un anticuerpo permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos en antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. 40 Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en cada una de las cadenas VH y VL.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "proteína TIGIT" o "antígeno TIGIT" o "TIGIT" se usan indistintamente y se refieren al inmunorreceptor de linfocitos T humanos (número de acceso a GenBank:

NM_173799) que se une al receptor de poliovirus (PVR - también conocido como CD155). TIGIT también se conoce como VSIG9, VSTM3 o WUCAM. Las referencias a TIGIT incluyen la proteína TIGIT humana natural expresada de forma natural en el hospedador humano y/o en la superficie de líneas celulares cultivadas humanas, así como formas recombinantes y fragmentos de la misma y también formas mutantes de origen natural.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión" comprende una región de un polipéptido que es responsable de la unión selectiva a un antígeno diana de interés (por ejemplo, TIGIT). Los dominios de unión comprenden al menos un sitio de unión. Dominios de unión ejemplares incluyen un dominio variable de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden comprender un solo sitio de unión o múltiples (por ejemplo, dos, 10 tres o cuatro) sitios de unión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" una proteína indicada (por ejemplo, un anticuerpo contra TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo) se refiere al origen del polipéptido. En una realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que deriva de un polipéptido de partida particular es una secuencia CDR o secuencia relacionada con la misma. En una realización, la secuencia de aminoácidos que deriva de un polipéptido de partida particular no es contigua. Por ejemplo, en una realización, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR derivan de un anticuerpo de partida. En una realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que deriva de un polipéptido o secuencia de aminoácidos de partida particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la de la secuencia de partida, o una parte de la misma, en la que la parte consiste en al menos 3-5 aminoácidos, al menos 5-10 aminoácidos, al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, o al menos 30-50 aminoácidos, o que un experto en la materia puede identificar de otro modo que tiene su origen en la secuencia de partida. En una realización, la una o más secuencias CDR derivadas del anticuerpo de partida se alteran para producir secuencias CDR variantes, por ejemplo, variantes de afinidad, en las que las secuencias CDR variantes mantienen la actividad de unión a TIGIT.

25 Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservativa de aminoácido" es una en que el residuo aminoacídico se remplaza con un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido 30 glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo aminoacídico no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina puede remplazarse con otro residuo aminoacídico de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una hilera de aminoácidos puede remplazarse con una hilera estructuralmente similar que difiere en el orden y/o composición de los miembros de la familia de cadena lateral.

Como se usa en el presente documento, la expresión "parte de la cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de los dominios constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que 40 comprende una parte de la cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio de bisagra (por ejemplo, región de bisagra superior, central y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento de los mismos. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención puede comprender la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, una parte de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En otra realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención puede 45 carecer de al menos una parte de un dominio constante (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). En determinadas realizaciones, al menos uno, y preferiblemente la totalidad, de los dominios constantes derivan de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, en una realización preferida, la parte de la cadena pesada comprende un dominio de bisagra completamente humano. En otras realizaciones preferidas, la parte de la cadena pesada comprende una parte Fc completamente humana (por ejemplo, secuencias de dominio de bisagra, CH2 y 50 CH3 de una inmunoglobulina humana).

En determinadas realizaciones, los dominios constantes constituyentes de la parte de la cadena pesada son de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de la cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 derivado de una molécula IgG1 y una región de bisagra derivada de una molécula IgG3 o IgG4. En otras realizaciones, los dominios constantes son dominios químicos que comprenden partes de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una bisagra puede comprender una primera parte de una molécula IgG1 y una segunda parte de una molécula IgG3 o IgG4. Como se expone anteriormente, un experto en la materia comprenderá que los dominios constantes de la parte de la cadena pesada pueden modificarse de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural (de tipo silvestre). Es decir, los polipéptidos de la invención divulgada en el presente documento pueden comprender alteraciones y modificaciones en uno o más dominios constantes de la cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 o CH3) y/o en el dominio de la región constante de la cadena ligera (CL). Modificaciones ejemplares incluyen adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios.

65 Como se usa en el presente documento, las expresiones "región variable" y "dominio variable" se usan indistintamente y se pretende que tengan significado equivalente. El término "variable" se refiere al hecho de que

determinadas partes de los dominios variables VH y VL difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno diana. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados "bucles hipervariables" en cada dominio VL y dominio VH que forman parte del sitio de unión a 5 antígeno. El primer, segundo y tercer dominio hipervariable del dominio de la cadena ligera V_{λ} se denominan en el presente documento L1(λ), L2(λ) y L3(λ) y pueden definirse por comprender los residuos 24-33 (L1(λ), que consiste en 9, 10 u 11 residuos aminoácidos), 49-53 (L2(λ), que consiste en 3 residuos) y 90-96 (L3(λ), que consiste en 5 residuos) en el dominio VL (Morea *et al.*, Methods 20, 267-279, 2000). El primer, segundo y tercer dominio hipervariable del dominio de la cadena ligera V_{κ} se denominan en el presente documento L1(κ), L2(κ) y 10 L3(κ) y pueden definirse por comprender los residuos 25-33 (L1(κ), que consiste en 6, 7, 8, 11, 12 o 13 residuos), 49-53 (L2(κ), que consiste en 3 residuos) y 90-97 (L3(κ), que consiste en 6 residuos) en el dominio VL (Morea *et al.*, Methods 20, 267-279, 2000). El primer, segundo y tercer bucle hipervariable del dominio VH se denominan en el 15 presente documento H1, H2 y H3 y pueden definirse por comprender los residuos 25-33 (H1, que consiste en 7, 8 o 9 residuos), 52-56 (H2, que consiste en 3 o 4 residuos) y 91-105 (H3, muy variable en longitud) en el dominio VH (Morea *et al.*, Methods 20, 267-279, 2000).

Salvo que se indique de otro modo, los términos L1, L2 y L3 respectivamente se refieren al primer, segundo y tercer bucle hipervariable de un dominio VL, y abarcan bucles hipervariables obtenidos de ambos isotipos V_{κ} y V_{λ} . Los términos H1, H2 y H3 respectivamente se refieren al primer, segundo y tercer bucle hipervariable del dominio 20 VH, y abarcan bucles hipervariables obtenidos de cualquiera de los isotipos de cadena pesada conocidos, incluyendo γ , ϵ , δ , α o μ .

Los bucles hipervariables L1, L2, L3, H1, H2 y H3 pueden comprender, cada uno, parte de una "región determinante de complementariedad" o "CDR", como se define a continuación. Las expresiones "bucle hipervariable" y "región determinante de complementariedad" no son estrictamente sinónimas, ya que los bucles hipervariables (HV) se definen basándose en la estructura, mientras que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen basándose en la variabilidad de secuencia (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) y los límites de los HV y las CDR 25 pueden ser diferentes en algunos dominios VH y VL.

30 Las CDR de los dominios VL y VH pueden definirse típicamente por comprender los siguientes aminoácidos: residuos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en el dominio variable de la cadena ligera, y residuos 31-35 o 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en el dominio variable de la cadena pesada; (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, 35 Bethesda, MD, 1991). Por tanto, los HV pueden estar comprendidos dentro de las CDR correspondientes y las referencias en el presente documento a los "bucles hipervariables" de dominios VH y VL deben interpretarse abarcando también las correspondientes CDR, y viceversa, salvo que se indique de otro modo.

40 Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones flanqueantes (FR), como se define a continuación. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por los tres bucles hipervariables. Los bucles hipervariables en cada cadena se mantienen juntos en cercana proximidad por las FR y, con los bucles hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. El análisis estructural de los anticuerpos reveló la relación entre la secuencia 45 y la forma del sitio de unión formado por las regiones determinantes de complementariedad (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227, 799-817, 1992; Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 175-182, 1990). A pesar de su alta variabilidad de secuencia, cinco de los seis bucles adoptan únicamente un pequeño repertorio de conformaciones de cadena principal, denominadas "estructuras canónicas". Estas conformaciones en primera instancia se determinan por la longitud de los bucles y en segundo lugar por la presencia de residuos clave en determinadas posiciones en los 50 bucles y en las regiones flanqueantes que determinan la conformación a través de su compactación, formación de enlaces de hidrógeno o la capacidad de asumir conformaciones de cadena principal inusuales.

55 Como se usa en el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios de combinación con antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos de la cadena pesada y también de los de la ligera. Estas regiones particulares se han descrito por Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616, 1977, de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196, 901-917, 1987, y por MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262, 732-745, 1996, donde las definiciones incluyen residuos aminoácidos solapantes o subconjuntos de residuos aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos aminoácidos 60 que abarcan las CDR como se definen por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen para su comparación. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR como se define por Kabat basada en comparaciones de secuencia.

Tabla 1: definiciones de CDR.

	Definiciones de CDR		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
CDR1 de V _H	31-35	26-32	30-35
CDR2 de V _H	50-65	53-55	47-58
CDR3 de V _H	95-102	96-101	93-101
CDR1 de V _L	24-34	26-32	30-36
CDR2 de V _L	50-56	50-52	46-55
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-96

¹La numeración de residuos sigue la nomenclatura de Kabat *et al.*, *supra*
²La numeración de residuos sigue la nomenclatura de Chothia *et al.*, *supra*
³La numeración de residuos sigue la nomenclatura de MacCallum *et al.*, *supra*

Como se usa en el presente documento, la expresión "región flanqueante" o "región FR" incluye los residuos aminoacídicos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (por ejemplo, usando la definición de Kabat de las CDR). Por lo tanto, una región flanqueante variable es entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero incluye solamente aquellos aminoácidos fuera de las CDR. Para el ejemplo específico de un dominio variable de la cadena pesada y para las CDR como se definen por Kabat *et al.*, la región flanqueante 1 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 1-30; la región flanqueante 2 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 36-49; la región flanqueante 3 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 66-94, y la región flanqueante 4 corresponde al dominio de la región variable desde el aminoácido 103 hasta el final de la región variable. Las regiones flanqueantes para la cadena ligera están separadas de forma similar por cada una de las CDR de la región variable de la cadena ligera. Asimismo, usando la definición de las CDR de Chothia *et al.* o McCullum *et al.*, los límites de la región flanqueante están separados por los extremos respectivos de las CDR como se describe anteriormente. En realizaciones preferidas, las CDR son como se definen por Kabat.

En anticuerpos de origen natural, las seis CDR presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que están colocadas específicamente para formar el sitio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios variables de la cadena pesada y ligera muestra menos variabilidad intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan regiones flanqueantes. Las regiones flanqueantes adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Por tanto, estas regiones flanqueantes actúan formando un armazón que proporciona la colocación de las seis CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercatenarias, no covalentes. El sitio de unión a antígeno formado por las CDR colocadas define una superficie complementaria al epítopo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítopo del antígeno inmunorreactivo. La posición de las CDR puede identificarla fácilmente un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos aminoacídicos que el anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivó) por la unión al antígeno (es decir, unión específica a TIGIT). Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, por ejemplo, un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH), un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento F(ab')2, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (DAb). Los fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo o por medios recombinantes.

Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de posibles sitios de unión a diana en un polipéptido. Cada sitio de unión a diana se une específicamente a una molécula diana o sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión a diana, cada sitio de unión a diana puede unirse específicamente a la misma molécula o a moléculas diferentes (por ejemplo, puede unirse a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítopos en el mismo antígeno). Las presentes moléculas de unión tienen al menos un sitio de unión específico para TIGIT.

Como se usa en el presente documento, el término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse (por ejemplo, inmunorreaccionar con) un diana dada, por ejemplo, TIGIT. Un polipéptido puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a una diana o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a la misma diana o a diferentes dianas. En una realización, un anticuerpo de la invención es específico para más de una diana. Por ejemplo, en una realización, una

molécula de unión multiespecífica de la invención se une a TIGIT y una segunda molécula diana. En este contexto, la segunda molécula diana es una molécula distinta de TIGIT.

5 Como se usa en el presente documento, el término "sintético", con respecto a polipéptidos, incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que no se de origen natural. Por ejemplo, polipéptidos que no son de origen natural que son formas modificadas de polipéptidos de origen natural (por ejemplo, que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o eliminación) o que comprenden una primera secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no) que está ligada en una secuencia lineal de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no) a la que no está ligada de forma natural en la naturaleza.

10 Como se usa en el presente documento, el término "manipulado" incluye manipulación de moléculas de ácido nucleico o polipeptídicas por medios sintéticos (por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis peptídica *in vitro*, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas). Preferiblemente, los 15 anticuerpos de la invención se han manipulado para mejorar una o más propiedades, tal como unión al antígeno, estabilidad/semivida o función efectora.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo modificado" incluye formas sintéticas de anticuerpos que se alteran de modo que no sean de origen natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos partes de la cadena pesada, pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos de dominio eliminado o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para que se unan a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos en un solo antígeno; moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv y similares. Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5 892 019. Además, la expresión "anticuerpo modificado" incluye formas multivalentes de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo trivalentes, tetravalentes, etc., que se unen a tres o más copias del mismo antígeno). En otra realización, un anticuerpo modificado de la invención es una proteína de fusión que comprende al menos una parte de la cadena pesada que carece de un dominio CH2 y que comprende un dominio de unión de un polipéptido que comprende la parte de unión de un miembro de una pareja de ligando y receptor.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo modificado" también puede usarse en el presente documento para hacer referencia a variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo contra TIGIT de la invención. Un experto en la materia entenderá que un anticuerpo contra TIGIT de la invención puede modificarse para que produzca un anticuerpo variante contra TIGIT que varía en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo contra TIGIT del que derivó. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que dan lugar a sustituciones o cambios conservativos en residuos aminoacídicos "no esenciales" (por ejemplo, en residuos CDR y/o flanqueantes). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el remplazo de uno o más aminoácidos con un aminoácido de origen natural o no natural.

40 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general el dominio de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, Fab biespecíficos y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias, un fragmento variables monocatenario (scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmento de anticuerpo (véase Holliger y Hudson, *Nature Biotechnol.* 23:1126-1136, 2005).

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "variante de afinidad" se refiere a un anticuerpo variante que muestra uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos en comparación con un anticuerpo contra TIGIT de referencia de la invención, en el que la variante de afinidad muestra una afinidad alterada por TIGIT en comparación con el anticuerpo de referencia. Preferiblemente, la variante de afinidad mostrará afinidad mejorada por TIGIT, en comparación con el anticuerpo contra TIGIT de referencia. La mejora puede ser evidente como una KD menor por TIGIT, o una velocidad de disociación más lenta para TIGIT. Las variantes de afinidad típicamente muestran uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos en las CDR, en comparación con el anticuerpo contra TIGIT de referencia. Dichas sustituciones pueden provocar el remplazo del aminoácido original presente en una posición dada en las CDR con un residuo aminoacídico diferente, que puede ser un residuo aminoacídico de origen natural o un residuo aminoacídico que no es de origen natural. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas.

55 Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" o "afinidad de unión" debe entenderse basándose en el significado habitual en la técnica en el contexto de unión de anticuerpo, y refleja la fuerza y/o estabilidad de la unión entre un antígeno y un sitio de unión en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

60 Los anticuerpos anti-TIGIT proporcionados en el presente documento se caracterizan por unión de alta afinidad a TIGIT humano. La afinidad de unión por TIGIT puede evaluarse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

65 La afinidad de unión también puede expresarse como la constante de disociación para un anticuerpo particular, o la

K_D . Cuanto menor sea el valor de K_D , las fuerte será la interacción de unión entre un anticuerpo y su antígeno diana. En una realización, la afinidad de unión de un clon Fab que comprende un emparejamiento VH/VL definido puede evaluarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por el sistema ForteBio™, por valoración en equilibrio en solución-MSD (SET), o por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el sistema 5 Biacore™ como se describe en los ejemplos adjuntos. Los fragmentos Fab de los anticuerpos de acuerdo con la invención típicamente muestran una K_D por TIGIT medida por ForteBio™ en el intervalo de 1×10^{-10} a 5×10^{-8} M, opcionalmente de 7×10^{-10} a 4×10^{-8} M. Una K_D dentro de este intervalo puede aceptarse como indicación de que el Fab, y un mAb bivalente correspondiente, muestra unión de alta afinidad a hTIGIT. Los mAb bivalentes que 10 comprenden dos Fab que muestran (individualmente) una K_D por hTIGIT dentro de los intervalos indicados también se acepta que muestran unión de alta afinidad a hTIGIT. Una K_D MSD en el intervalo de 1×10^{-11} a 5×10^{-9} , opcionalmente de 2×10^{-11} a 1×10^{-9} puede aceptarse como una indicación de unión de alta afinidad a hTIGIT. Los fragmentos Fab de los anticuerpos de acuerdo con la invención típicamente muestran una K_D por TIGIT medida por Biacore™ en el intervalo de 1×10^{-10} M a 1×10^{-9} M, opcionalmente de 1×10^{-10} a 7×10^{-10} , opcionalmente de 2×10^{-10} a 7×10^{-10} M. Una K_D dentro de este intervalo puede aceptarse como indicación de que el Fab, y un mAb bivalente 15 correspondiente, muestra unión de alta afinidad a hTIGIT.

La afinidad de unión a TIGIT humano también puede evaluarse usando un sistema celular como se describe en los ejemplos adjuntos, en los mAb se ensayan para la unión a células de mamífero (líneas celulares o células *ex vivo* que expresan TIGIT), por ejemplo, usando ELISA o citometría de flujo. La alta afinidad por TIGIT puede indicarse, 20 por ejemplo, por una CE_{50} de no más de 0,5 nM por análisis citométrico de flujo (por ejemplo, FACS) tal como el descrito en el ejemplo 10. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención muestran una CE_{50} de unión celular de no más de 0,5 nM, opcionalmente no más de 0,2 nM. La determinación celular de la afinidad expresada como CE_{50} se determina preferiblemente usando células Jurkat que expresan hTIGIT o linfocitos T CD8 primarios de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) humanos.

25 Como se usa en el presente documento, "linfocitos Treg", o simplemente "Treg", se refieren a linfocitos T CD4+ reguladores, es decir, linfocitos T que disminuyen la una o más funciones efectoras de linfocitos T convencionales (linfocitos T CD8 o CD4). Los Treg pueden identificarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando citometría de flujo para identificar células CD4 que expresen niveles altos de CD25 y niveles bajos o ausencia de CD127.

30 Como se resume anteriormente, la invención se refiere, al menos en parte, a anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a TIGIT. Las propiedades y características de los anticuerpos contra TIGIT, y fragmentos de anticuerpo, de acuerdo con la invención, se describirán ahora en mayor detalle.

35 **ANTICUERPOS ANTI-TIGIT**

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TIGIT humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación 40 de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:

HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16 (YTFTSYMMH),
 45 HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
 HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
 LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
 50 LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), and
 LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63 (QQYFSPPWT).

55 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno, que comprende una combinación de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 221 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 222 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.

60 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno, que comprende una combinación de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 219 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos

mostrada como la SEQ ID NO: 220 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.

5 Para cada una de las combinaciones VH/VL específicas enumeradas anteriormente, también es permisible, y está dentro del alcance de la invención, combinar un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a la secuencia del dominio VH indicada con un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a la secuencia del dominio VL indicada. Realizaciones en las que la secuencia de aminoácidos del dominio VH muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de VH de referencia dada, no obstante, pueden comprender CDR de la

10 cadena pesada que son idénticas a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la secuencia de referencia, aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes. Asimismo, realizaciones en las que la secuencia de aminoácidos del dominio VL muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de referencia dada, no obstante, pueden comprender CDR de la cadena ligera que son idénticas a

15 LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la secuencia de referencia, aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes.

En el párrafo precedente, y en otra parte de en el presente documento, la estructura de los anticuerpos/fragmentos de unión a antígeno se define basándose en el % de identidad de secuencia con una secuencia de referencia indicada (con una SEQ ID NO dada). En este contexto, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse comparando estas dos secuencias alineadas de una manera óptima y en que la secuencia de aminoácidos a comparar puede comprender adicionales o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las que el residuo aminoacídico es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Típicamente, la ventana de comparación corresponderá a la longitud completa de la secuencia que se esté comparando. Por ejemplo, es posible usar el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros usados los dados por defecto (en particular para los parámetros "penalización por abertura de hueco": 5, y "penalización por ampliación de hueco": 2; siendo la matriz elegida, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), calculándose el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar directamente por el programa. Determinar la identidad de secuencia de una secuencia de consulta con una secuencia de referencia pertenece a las habilidades de los expertos en la materia y puede realizarse usando un programa informático de análisis disponible en el mercado tal como BLAST™.

40 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18, y la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63.

45 En determinadas realizaciones de este tipo, el dominio variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 221 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 222 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma. En determinadas realizaciones de este tipo, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera son el dominio VH y VL del anticuerpo 31282 proporcionado en el presente documento.

50 El anticuerpo 31282 proporcionado en el presente documento deriva del anticuerpo 29489. El anticuerpo 31282 se produjo a partir de 29489 mediante una sustitución M-T en el aminoácido 116 en la región FR4 de VH. Se entiende que esta sustitución elimina un posible sitio de oxidación del anticuerpo y, de este modo, mejora la estabilidad sin afectar a la función. Los anticuerpos 31282 y 29489, por tanto, comparten secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 idénticas, que difieren solamente en la región flanqueante.

55 Por consiguiente, en determinadas realizaciones de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención, el dominio variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 219 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 220 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma. En determinadas realizaciones de este tipo, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera son el dominio VH y VL del anticuerpo 29489 proporcionado en el presente documento.

65 Realizaciones en las que la secuencia de aminoácidos del dominio VH muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 221 o 219, no obstante, pueden comprender CDR de la

5 cadena pesada que son idénticas a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la SEQ ID NO:221 y 219 (SEQ ID NO:16, 17 y 18, respectivamente), aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes. Asimismo, realizaciones en las que la secuencia de aminoácidos del dominio VL muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 222 o 220 , no obstante, pueden

10 comprender CDR de la cadena ligera que son idénticas a LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la SEQ ID NO:222 y 220 (SEQ ID NO:61, 62 y 63, respectivamente), aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes.

10 Se desarrollaron anticuerpos contra TIGIT ejemplares descritos en el presente documento y que tienen las secuencias expuestas en la figura 1-5 a partir de 5 clones de anticuerpo precursores. La tabla 2 resume el linaje de los anticuerpos descritos en el presente documento. Se expresaron anticuerpos humanos precursores vírgenes anti-TIGIT en levadura y se seleccionaron aquellos que mostraban alta actividad funcional contra TIGIT (filas grises, denominadas 26...), y se sometieron a maduración de la afinidad. Los anticuerpos de afinidad madurada seleccionados entonces se expresaron en células de mamífero (filas blancas por debajo de cada precursor, denominadas 29... o 3...). Además, el anticuerpo 31282 se produjo a partir de 29489 mediante una sustitución M-T en el aminoácido 116 en la región FR4 de VH. Se entiende que esta sustitución elimina un posible sitio de oxidación del anticuerpo y, de este modo, mejora la estabilidad sin afectar a la función. Además, el anticuerpo 31288 se produjo a partir de 29494 mediante una sustitución V-L en el aminoácido 2 en la región FR1 de VH y mediante una sustitución M-T en el aminoácido 120 en la región FR4 de VH. Se entiende que la sustitución V-L restaura la secuencia de la línea germinal VH4-39 y la sustitución M-T elimina el posible sitio de oxidación del anticuerpo y, de este modo, mejora la estabilidad sin afectar a la función.

15 **Tabla 2**

Clon de anticuerpo	Linaje de CDR3 de VH	Método de optimización	Línea germinal de VH
26518	26518	Precursor	VH3-07
29478	26518	H1/H2/H3	VH3-30
26452	26452	Precursor	VH1-46
29487	26452	H1/H2/H3	VH1-46
29489	26452	H1/H2/H3	VH1-46
31282	29489	Mutación aminoacídica M116T	VH1-46
26486	26486	Precursor	VH4-0B
29499	26486	H1/H2/H3	VH4-39
29494	26486	H1/H2/H3	VH4-39
31288	29494	Reversión a la línea germinal + mutación aminoacídica M116T	VH4-39
32919	31288	L1/L2/L3	VH4-39
32931	31288	L1/L2/L3	VH4-39
26521	26521	Precursor	VH1-69
29513	26521	H1/H2/H3	VH1-69
26493	26493	Precursor	VH3-09
29520	26493	H1/H2/H3	VH3-09
29523	26493	H1/H2/H3	VH3-33
29527	26493	H1/H2/H3	VH3-30
26432	26432	Precursor	VH1-69
32959	26432	H1/H2/H3	VH1-69

25 Los anticuerpos de segunda generación muestran mayor afinidad que los anticuerpos precursores respectivos.

En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio VH derivado de la línea germinal de la región V humana VH1-46.

30 Un dominio VH "deriva de" una secuencia de la línea germinal de la región V particular si la secuencia de la región variable de la cadena pesada deriva más probablemente de la línea germinal dada que de cualquier otra.

EPÍTOPO TIGIT

35 También se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TIGIT humano en un epítopo que comprende los residuos Q56 y 1109. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede

5 unirse a TIGIT humano al menos en los residuos Q56, N58 y 1109. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a TIGIT humano en un epítopo que comprende los residuos Q56, N58 y 1109 y opcionalmente uno o más de los residuos E60, I68, L73 y H76. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a TIGIT humano en un epítopo que comprende los residuos Q56, N58, E60, I68, L73, H76 y 1109.

10 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a TIGIT humano en un epítopo que consiste en los residuos de TIGIT Q56, N58, E60, I68, L73, H76 y 1109. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse al mismo epítopo que el anticuerpo 31282.

15 10 Cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo de TIGIT humano que comprende los residuos de TIGIT indicados, el anticuerpo se une a cada uno de estos residuos y opcionalmente otros residuos de TIGIT. Cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo de TIGIT humano que consiste en los residuos de TIGIT Q56, N58, E60, I68, L73, H76 y 1109, el anticuerpo se une a cada uno de estos residuos y no a otros residuos de TIGIT.

20 15 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a TIGIT humano en un epítopo dado si entra en contacto con el uno o más residuos aminoacídicos de TIGIT indicados cuando se une a TIGIT. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo entra en contacto con un residuo de TIGIT si, cuando está en el complejo proteínico formado por la unión del anticuerpo-TIGIT, el residuo cumple cada uno de los siguientes criterios: (i) tiene una contribución de energía libre de unión calculada mayor de 0,3 kcal/mol, (ii) tiene un factor B promediado experimental menor que el factor B medio de todos los residuos en la estructura de rayos X, (iii) genera al menos 3 pares de contactos interatómicos de átomos pesados con átomos del anticuerpo a una distancia menor de o igual a 4,0 Angstroms, (iv) no genera solamente enlaces de hidrógeno expuestos al disolvente o interacciones iónicas, (v) si es un residuo polar no aromático (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys o Arg), genera al menos un enlace de hidrógeno o interacción iónica con el anticuerpo. El cálculo de la energía libre de unión pertenecería a las habilidades de los expertos en la materia. Preferiblemente, la energía libre de unión se calcula usando un campo de fuerza empírico, preferiblemente FoldX. FoldX sería conocido por los expertos en la materia y está disponible al público en <http://foldxsuite.cra.eu/>. El cálculo de la energía libre de unión usando FoldX también se describe en Guerois *et al.* J. Mol. Biol. 2002; 320(2):369-87. Como sería conocido por los expertos en la materia, los átomos pesados son todos átomos que no son de hidrógeno (incluyendo C, N, O, S).

30 25 Por consiguiente, también se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que entra en contacto con TIGIT humano al menos en los residuos Q56 y 1109. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede entrar en contacto con TIGIT humano al menos en los residuos Q56, N58 y 1109. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede entrar en contacto con TIGIT humano al menos en los residuos Q56, N58 y 1109 y opcionalmente uno o más de los residuos E60, I68, L73 y H76. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede entrar en contacto con TIGIT humano al menos en los residuos Q56, N58, E60, I68, L73, H76 y 1109.

35 40 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede entrar en contacto con TIGIT humano solamente en los residuos Q56, N58, E60, 168, L73, H76 y 1109.

45 45 Los medios para determinar los residuos de TIGIT que entran en contacto con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno son conocidos por los expertos en la materia, incluyendo cristalografía de rayos X, tal como lo descrito en el ejemplo 23.

50 50 También se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

SUBTIPOS DE ANTICUERPO

55 55 Los anticuerpos contra TIGIT pueden adoptar diversas realizaciones diferentes en que está presente tanto un dominio VH como un dominio VL. El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), siempre que muestren la especificidad inmunológica apropiada por una proteína TIGIT humana. La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos) en el antígeno, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante o epítopo en el antígeno.

- En realizaciones no limitantes, los anticuerpos contra TIGIT proporcionados en el presente documento pueden comprender dominios CH1 y/o dominios CL, cuya secuencia de aminoácidos es completa o sustancialmente humana. Si el anticuerpo contra TIGIT está destinado a uso terapéutico humano, es típico que la región constante completa del anticuerpo, o al menos una parte de la misma, tenga secuencia de aminoácidos completa o sustancialmente humana. Por lo tanto, uno o más o cualquier combinación del dominio CH1, la región de bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CL (y el dominio CH4 si está presente) puede ser completa o sustancialmente humana con respecto a su secuencia de aminoácidos. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo humano, siendo IgG4 e IgG1 humanas particularmente preferidas.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Ventajosamente, el dominio CH1, la región de bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CL (y el dominio CH4 si está presente) pueden tener todos secuencia de aminoácidos completa o sustancialmente humana. En el contexto de la región constante de un anticuerpo humanizado o químico, o un fragmento de anticuerpo, la expresión "sustancialmente humana" se refiere a una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, o al menos un 92 %, o al menos un 95 %, o al menos un 97 %, o al menos un 99 % con una región constante humana. La expresión "secuencia de aminoácidos humana", en este contexto, se refiere a una secuencia de aminoácidos que está codificada por un gen de inmunoglobulina humana, que incluye genes de la línea germinal, reordenados y somáticamente mutados. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo humano, siendo IgG4 e IgG1 humanas particularmente preferidas.
- También se proporcionan anticuerpos contra TIGIT que comprenden dominios constantes de secuencia "humana" que se han alterado, mediante una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácido con respecto a la secuencia humana.
- Los anticuerpos contra TIGIT proporcionados en el presente documento pueden ser de cualquier isotipo. Los anticuerpos destinados a uso terapéutico humano típicamente serán del tipo IgA, IgD, IgE IgG, IgM, a menudo del tipo IgG, en cuyo caso pueden pertenecer a cualquiera de las cuatro subclases IgG1, IgG2a y b, IgG3 o IgG4. Dentro de cada una de estas subclases, está permitido hacer una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido dentro de la parte Fc, o hacer otras modificaciones estructurales, por ejemplo, para potenciar o reducir las funcionalidades dependientes de Fc.
- En determinadas realizaciones preferidas, los anticuerpos contra TIGIT proporcionados en el presente documento son anticuerpos IgG. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de acuerdo con la invención son anticuerpos IgG1. En determinadas realizaciones alternativas, los anticuerpos de acuerdo con la invención son anticuerpos IgG4.
- Los anticuerpos IgG4 son conocidos por experimentar intercambio del brazo Fab (FAE), que puede provocar propiedades farmacodinámicas impredecibles de un anticuerpo IgG4. Se ha demostrado que el FAE se evitaba mediante la mutación S228P en la región de bisagra (Silva *et al.* J Biol Chem. 27 de febrero de 2015; 290(9): 5462-5469). Por lo tanto, en determinadas realizaciones de este tipo, en las que un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo comprende la mutación S228P, es decir, una mutación de serina a prolina en la posición 228 (de acuerdo con la numeración EU).
- En realizaciones no limitantes, se contempla que pueden hacerse una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido dentro de la región constante de la cadena pesada y/o la ligera, particularmente dentro de la región Fc. Las sustituciones de aminoácido pueden provocar el remplazo del aminoácido sustituido con un aminoácido de origen natural diferente, o con un aminoácido no natural o modificado. También están permitidas otras modificaciones estructurales, tales como, por ejemplo, cambios en el patrón de glucosilación (por ejemplo, mediante adición o eliminación de sitios de glucosilación ligados a N u O). Dependiendo del uso pretendido del anticuerpo contra TIGIT, puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a sus propiedades de unión a receptores de Fc, por ejemplo, para modular la función efectora.
- En determinadas realizaciones, los anticuerpos contra TIGIT pueden comprender una región Fc de un isotipo de anticuerpo dado, por ejemplo, IgG1 humana, que se modifica para reducir o eliminar sustancialmente una o más funciones efectoras del anticuerpo asociadas de forma natural con ese isotipo de anticuerpo.
- Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos con funciones efectoras líticas celulares pueden ser eficaces en reducir las poblaciones de linfocitos Treg, pero, sorprendentemente, sin afectar de forma adversa a las poblaciones de linfocitos T efectores convencionales. Esta selectividad puede permitir una inhibición más potente del efecto regulador de los Treg, aunque reteniendo los linfocitos T efectores antitumorales.
- Por lo tanto, en determinadas realizaciones alternativas, los anticuerpos contra TIGIT retienen una o más de las funciones efectoras del anticuerpo asociadas de forma natural con ese isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos contra TIGIT de la invención pueden ser anticuerpos IgG1 que retienen la funcionalidad ADCC. En realizaciones adicionales, los anticuerpos contra TIGIT pueden comprender una región Fc de un isotipo de anticuerpo dado, por ejemplo, IgG1 humana, que se modifica para potenciar una o más funciones efectoras del anticuerpo asociadas de forma natural con ese isotipo de anticuerpo. En este contexto, las "funciones efectoras del

anticuerpo" incluyen una o más o todas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-TIGIT es un anticuerpo modificado.

- 5 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo específico para TIGIT y un segundo brazo específico para una segunda diana. En las realizaciones preferidas, la segunda diana es una molécula de punto de control inmunitario. En determinadas realizaciones, la segunda diana es OX40.
- 10 En determinadas realizaciones, la segunda diana es ICOS. En determinadas realizaciones, la segunda diana es GITR. En determinadas realizaciones, la segunda diana es 4-1BB. En determinadas realizaciones, la segunda diana es PD-1. En determinadas realizaciones, la segunda diana es PD-L1. En determinadas realizaciones, el primer brazo específico de TIGIT comprende una combinación de secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de un anticuerpo de acuerdo con la invención. En determinadas realizaciones, el primer brazo comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en el que la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18, y la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63.

20 Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que "compiten de forma cruzada" con los anticuerpos contra TIGIT divulgados en el presente documento son que se unen a TIGIT humano en uno o más sitios que son idénticos a, o solapantes con, el uno o más sitios en que se unen los presentes anticuerpos contra TIGIT. Los anticuerpos monoclonales competidores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden identificarse, por ejemplo, mediante un ensayo de competición de anticuerpos. Por ejemplo, una muestra de TIGIT humano purificado o parcialmente purificado puede unirse a un soporte sólido. Después, se añade un compuesto de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo sospechoso de poder competir con dicho compuesto de anticuerpo de la invención. Una de las dos moléculas se marca. Si el compuesto marcado y el compuesto no marcado se unen en sitios diferentes y diferenciados en TIGIT, el compuesto marcado se unirá al mismo nivel esté presente o no el compuesto competidor sospechoso. Sin embargo, si los sitios de interacción son idénticos o solapantes, el compuesto no marcado competirá, y la cantidad de compuesto marcado unido al antígeno se reducirá. Si el compuesto no marcado está presente en exceso, muy poco, si acaso, compuesto marcado se unirá.

25 Para los fines de la presente invención, los anticuerpos monoclonales competidores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son los que disminuyen la unión de los presentes compuestos de anticuerpo a TIGIT en aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 %. Los detalles de procedimientos para realizar dichos ensayos de competición son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988, 567-569, 1988, ISBN 0-87969-314-2. Dichos ensayos pueden hacerse cuantitativos usando anticuerpos purificados. Se establece una curva patrón valorando un anticuerpo contra sí mismo, es decir, se usa el mismo anticuerpo tanto para el marcador como para el competidor. Se valora la capacidad de un anticuerpo monoclonal competidor no marcado o fragmento de unión a antígeno del mismo de inhibir la unión de la molécula marcada a la placa. Los resultados se representan, y se comparan las concentraciones necesarias para conseguir el grado deseado de inhibición de la unión.

30 45 **LOS ANTICUERPOS DE LA INVENCION MUESTRAN ALTA AFINIDAD POR TIGIT Y COMPITEN CON CD155**

40 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención muestran alta afinidad por TIGIT humano. En determinadas realizaciones, Los fragmentos Fab de los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una K_D por TIGIT medida por ForteBio™ en el intervalo de 1×10^{-10} a 5×10^{-8} M, opcionalmente de 7×10^{-10} a 4×10^{-8} M. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una K_D MSD en el intervalo de 1×10^{-11} a 5×10^{-9} M, opcionalmente de 2×10^{-11} a 1×10^{-9} . En determinadas realizaciones, Los fragmentos Fab de los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una K_D por TIGIT medida por Biacore™ en el intervalo de 1×10^{-10} M a 1×10^{-9} M, opcionalmente de 1×10^{-10} a 7×10^{-10} M, opcionalmente de 2×10^{-10} a 7×10^{-10} M.

Tabla 3

Clon	ForteBio KD de Fab Biotinilado TIGIT humano HIS (M) Monovalente	ForteBio KD de Fab TIGIT de ratón-Fc (M) Monovalente	ForteBio KD de Fab TIGIT de macaco-Fc (M) Monovalente	ForteBio KD de IgG TIGIT humano-Fc (M) Avid	MSD - KD monovalente (M), TIGIT humano-His	Biacore - KD monovalente (M), TIGIT humano-His	Unión celular de Jurkat TIGIT humano FON (Fold Over Negative - factor sobre negativo)	Unión celular de Jurkat TIGIT de ratón FON (Fold Over Negative - factor sobre negativo)
26518	1,24E-09	N.B.	4,47E-09	6,30E-10			154	233
29478	7,03E-10	9,18E-08	1,26E-09	5,27E-10			182	500
26452	5,08E-09	N.B.	N.B.	4,74E-10			164	47
29487	2,08E-09	N.B.	1,55E-07	3,96E-10			161	95
29489	8,81E-10	N.B.	3,52E-08	3,53E-10	1,1E-10	2,48E-10	162	187
31282	1,34E-09	N.B.	3,77E-08			2,94E-10		
26486	2,19E-08	N.B.	N.B.	5,89E-10			143	199
29499	1,66E-09	2,55E-08	1,45E-08	3,19E-10	1,9E-11		164	541
29494	1,66E-09	5,36E-08	1,86E-08	3,76E-10	7,0E-11	2,70E-10	164	511
31288	2,09E-09			2,51E-08		1,92E-10		
32919	1,42E-09			6,57E-09			680	
32931	1,18E-09			1,97E-09			741	
29499	1,66E-09	2,55E-08	1,45E-08	3,19E-10	1,9E-11		164	541
26521	9,87E-09	N.B.	1,49E-07	5,41E-10			146	218
29513	7,74E-10	8,55E-08	9,56E-09	3,92E-10	2,5E-11		156	406
26493	4,06E-08	2,67E-08	N.B.	1,49E-09			80	463
29520	1,31E-09	1,95E-09	2,68E-09	3,84E-10	2,1E-10	7,16E-10	166	535
29523	3,84E-09	1,89E-08	2,79E-08	5,31E-10	1,7E-09		150	502
29527	1,33E-09	2,02E-08	1,76E-08	3,50E-10	6,4E-10		142	414
26432	1,31E-08	N.B.	N.B.	4,62E-09				

5 Como se demuestra en los ejemplos, el anticuerpo 31282 muestra afinidad sorprendentemente alta por TIGIT expresado en células transgénicas. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno proporcionado en el presente documento muestra una CE_{50} de unión por TIGIT humano de menos de 0,5 nM. En realizaciones preferidas de este tipo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de unión de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,4 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,3 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,15 nM. En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de unión por TIGIT humano de aproximadamente 0,1 nM. En realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende las CDR del anticuerpo 31282. Preferiblemente, la CE_{50} se determina usando células Jurkat que expresan TIGIT humano, como se describe en el ejemplo 18. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención reaccionan de forma cruzada con TIGIT de ratón y/o TIGIT de macaco.

20 Como los anticuerpos de segunda generación "29..." son descendencia de afinidad madurada de los anticuerpos precursores altamente funcionales, se espera que muestren propiedades funcionales al menos similares o equivalentes a los anticuerpos precursores, y viceversa.

25 Como se describe en el presente documento, en determinadas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención tiene afinidad equivalente por TIGIT expresado por linfocitos T CD8 y expresado por linfocitos Treg. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene "afinidad equivalente" por linfocitos T CD8 y linfocitos Treg si la afinidad por linfocitos T CD8 está en el intervalo de 0,5-1,5 veces la afinidad por linfocitos Treg. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene afinidad equivalente por linfocitos T CD8 y linfocitos Treg que muestra una afinidad por linfocitos Treg de 0,03 nM mostraría una afinidad por linfocitos T CD8 en el intervalo de 0,015-0,045 nM.

30 La tabla 3 proporciona un resumen de las propiedades de afinidad de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención, indicando las celdas grises los clones de anticuerpo precursor, con los anticuerpos de segunda y tercera generación de cada linaje mostrados inmediatamente debajo del anticuerpo precursor respectivo (véase también la tabla 2).

35 Como se demuestra en los ejemplos, el anticuerpo 31282 muestra afinidad sorprendentemente alta por TIGIT expresado en linfocitos T CD8+ primarios humanos. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un anticuerpo

5 anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno proporcionado en el presente documento muestra una CE_{50} de unión por TIGIT humano de menos de 0,5 nM. En realizaciones preferidas de este tipo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de unión de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,4 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 nM. En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de unión por TIGIT humano de aproximadamente 0,2 nM. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende las CDR del anticuerpo 31282. Preferiblemente, la CE_{50} se determina usando linfocitos T CD8+ de PBMC humanos, preferiblemente de un individuo sano, como se describe en el ejemplo 18.

10 Como se demuestra en los ejemplos adjuntos, en determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno de la invención muestran alta afinidad por linfocitos T CD8 que expresan TIGIT y alta afinidad por linfocitos Treg que expresan TIGIT. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno de la invención muestran una afinidad por linfocitos T CD8 que expresan TIGIT y linfocitos Treg que expresan TIGIT caracterizados por una CE_{50} menor de 0,5 nM, preferiblemente menor de 0,3 nM, preferiblemente menor de 0,2 nM.

15 En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno de la invención muestran afinidad equivalente por linfocitos T CD8 que expresan TIGIT y por linfocitos Treg que expresan TIGIT.

20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención (por ejemplo, anticuerpo 31282) muestran afinidad sorprendentemente alta por linfocitos T CD8+ de pacientes con cáncer. Esto es particularmente ventajoso, ya que aumentar la actividad efectora de linfocitos T de pacientes con cáncer mediante inhibición de la señalización de TIGIT puede dar lugar a un control tumoral más eficaz. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno proporcionado en el presente documento muestra una CE_{50} de unión de menos de 0,5 nM por TIGIT humano en linfocitos T CD8+ humanos de pacientes con cáncer. En realizaciones preferidas de este tipo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de unión de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,4 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 nM. En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} por TIGIT humano de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 0,2 nM. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende las CDR del anticuerpo 31282. Preferiblemente, la CE_{50} se determina usando linfocitos T CD8+ de PBMC recogidos de un paciente con cáncer, como se describe en el ejemplo 18.

30 30 Como se demuestra en los ejemplos adjuntos, en determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención compiten con CD155/PVR por la unión a TIGIT. En determinadas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención muestra competición con CD155, caracterizada por una CI_{50} de 0,2 nM o menos, preferiblemente 0,1 nM o menos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra competición con CD155, caracterizada por una CI_{50} de aproximadamente 0,05 nM o menos. En determinadas realizaciones preferidas, la CI_{50} mostrada es de aproximadamente 0,05 nM. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se espera que la competición de anticuerpos con CD155 por la unión a TIGIT disminuya los niveles de señalización mediada por TIGIT inducida por CD155, aumentando de este modo los niveles de activación de los linfocitos T efectores.

40 40 También se describen "variantes de afinidad" de los anticuerpos descritos en el presente documento.

45 La invención también proporciona una anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite de forma cruzada por la unión a TIGIT humano con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

LOS ANTICUERPOS DE LA INVENCIÓN PROMUEVEN LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE LOS LINFOCITOS T

50 50 Los anticuerpos de acuerdo con la invención (por ejemplo, anticuerpo 31282) son sorprendentemente eficaces en promover la actividad proinflamatoria de los linfocitos T CD8+. Como se demuestra en los ejemplos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la invención (especialmente 31282) son más eficaces en promover la actividad proinflamatoria de los linfocitos T CD8+ (indicada por la liberación de IFNg) que los anticuerpos anti-TIGIT de comparación (véase la figura 24). Esta eficacia mejorada frente a los anticuerpos de comparación se demostró en células indicadoras Jurkat transgénicas que expresan TIGIT y en linfocitos T CD8 primarios. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno proporcionado en el presente documento muestra una CE_{50} de activación de menos de 5 nM por TIGIT humano expresado por células indicadoras Jurkat como se describe en el ejemplo 19. En realizaciones preferidas de este tipo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 4 nM, preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 4 nM.

60 65 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno proporcionado en el presente documento muestra una CE_{50} de activación de menos de 0,4 nM por linfocitos T CD8 de individuos sanos como se describe en el ejemplo 19. La actividad de los linfocitos T CD8 (es decir, actividad proinflamatoria) puede medirse por la producción de citocinas inflamatorias (por ejemplo, IFNg). En realizaciones preferidas de este tipo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra una CE_{50} de aproximadamente 0,05 nM a aproximadamente

0,4 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 0,2 nM. Preferiblemente, la CE_{50} se determina usando linfocitos T CD8+ de PBMC recogidos de un individuo sano, como se describe en el ejemplo 19.

5 Se demuestra adicional y sorprendentemente en los ejemplos adjuntos que los anticuerpos anti-TIGIT proporcionados son eficaces en aumentar la actividad de linfocitos T gamma-delta ($\gamma\delta$ o g/d) (es decir, linfocitos T que expresan las subunidades TCR $\gamma\delta$, en oposición a las subunidades TCR $\alpha\beta$ convencionales). Dichos linfocitos T $\gamma\delta$ forman un componente distinto e importante del sistema inmunitario y la capacidad de los anticuerpos proporcionados en el presente documento de promover la actividad de estas células resalta la utilidad de los anticuerpos.

10 10 Por consiguiente, también se describe un método *in vitro* para promover la actividad de linfocitos T $\gamma\delta$, que comprende poner en contacto una población de linfocitos T $\gamma\delta$ con un anticuerpo anti-TIGIT.

15 15 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que el método promueve la actividad de linfocitos T $\gamma\delta$ y comprende poner en contacto una población de linfocitos T $\gamma\delta$ con un anticuerpo anti-TIGIT.

REDUCCIÓN SELECTIVA DE LINFOCITOS T-REG

20 20 Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos anti-TIGIT pueden reducir selectivamente linfocitos Treg que expresan TIGIT. Es decir, los anticuerpos anti-TIGIT reducen la proporción de linfocitos Treg que expresan TIGIT con respecto a la población total de linfocitos T a un grado mayor que reducen la proporción de linfocitos T CD4 o CD8 efectores o de memoria.

25 25 En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo duce reduce selectivamente linfocitos Treg que expresan TIGIT.

30 30 Esta reducción selectiva de linfocitos Treg que expresan TIGIT puede estar mediada mediante lisis selectiva de los Treg que expresan TIGIT (por ejemplo, mediante ADCC o CDC (véanse las figuras 20, 21 y 25). Se entiende que los Treg que expresan TIGIT son células reguladoras más potentes que los Treg que no expresan TIGIT. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se espera que la reducción selectiva por lisis de linfocitos Treg que expresan TIGIT aumente la función efectora de los linfocitos T (por ejemplo, citotoxicidad mediada por linfocitos T, liberación de citocinas proinflamatorias) reduciendo el número global de linfocitos Treg, pero también reduciendo los linfocitos Treg que muestran la función reguladora más potente. Esta función efectora de los linfocitos T aumentada se demuestra en la figura 24.

35 35 Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención lisan selectivamente los linfocitos Treg que expresan TIGIT.

40 40 La reducción selectiva de linfocitos Treg que expresan TIGIT también puede mediarse induciendo la internalización del receptor TIGIT de modo que ya no se exprese en la membrana celular. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, induciendo la internalización de TIGIT de modo que los linfocitos Treg TIGIT+ lleguen a ser linfocitos Treg TIGIT-, se espera que la función reguladora de estas células llegue a ser menos potente (ya que los Treg TIGIT+ son células reguladoras más potentes). Como resultado de la internalización del receptor y la posterior bajada en la potencia reguladora de estos Treg, se espera que la función efectora de los linfocitos T aumente. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención inhiben la actividad supresora de los linfocitos Treg que expresan TIGIT, preferiblemente induciendo la internalización de TIGIT por los linfocitos Treg que expresan TIGIT.

50 50 Es particularmente ventajoso que los anticuerpos anti-TIGIT de acuerdo con la invención muestren alta afinidad por linfocitos T CD8 y linfocitos Treg y también muestren reducción selectiva de linfocitos Treg, promoviendo de este modo la función efectora de los linfocitos T mediante dos mecanismos. La retención de la función efectora del anticuerpo (por ejemplo, ADCC, CDC) provoca la reducción eficaz de los Treg y la selectividad significa que la función efectora del anticuerpo no provoca reducción indeseada de los linfocitos T efectores. La selectividad es particularmente sorprendente ya que los intentos previos por producir un anticuerpo anti-TIGIT han buscado eliminar la función efectora del anticuerpo para evitar la lisis de los linfocitos T efectores que expresan TIGIT. Además, como los anticuerpos contra TIGIT de la invención muestran afinidad por linfocitos T efectores (por ejemplo, linfocitos T CD8), la señalización mediada por TIGIT en estas células puede inhibirse por competición por la unión a CD155 y/o induciendo la internalización de TIGIT en los linfocitos T efectores. En combinación, estos efectos de los anticuerpos de la invención pueden provocar una regulación por aumento significativa de la función efectora de los linfocitos T.

55 55 Propiedades ventajosas sorprendentes adicionales mostradas por los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la invención incluyen aumentar la función efectora de los linfocitos T (por ejemplo, liberación de citocinas proinflamatorias) de linfocitos de infiltración tumoral (TIL). La exposición al microentorno tumoral puede dar lugar a que los TIL muestren fenotipos anárgicos o denominados "agotados", posiblemente debido a sobreexposición del antígeno y/o un microentorno tumoral inmunosupresor. La potenciación de la función efectora de

- los TIL es deseable ya que estas células son las que se infiltran en el propio tumor y, por tanto, están ubicadas en el lugar más adecuado para reducir el tamaño o el crecimiento del tumor; sin embargo, debido al fenotipo anérgico o agotado de muchos TIL, se espera que sea difícil potenciar su función efectora. El aumento en la respuesta proinflamatoria de los TIL después de la exposición a los anticuerpos de la invención, por lo tanto, es sorprendente e indica que los anticuerpos pueden ser agentes terapéuticos particularmente eficaces. Aún más propiedades ventajosas sorprendentes mostradas por los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen la capacidad de aumentar la actividad proinflamatoria de los linfocitos T gamma-delta ($\gamma\delta$). La capacidad de promover la actividad de linfocitos T no convencionales como los linfocitos T $\gamma\delta$ no se ha informado previamente para un anticuerpo anti-TIGIT y ofrece la posibilidad de tratar enfermedades distintas del cáncer en que se sabe que los linfocitos T $\gamma\delta$ son importantes. Por ejemplo, se ha informado de que los linfocitos T $\gamma\delta$ están implicados en la respuesta a infección patógena (bacteriana, vírica (por ejemplo, CMV), fúngica), y también de que tienen una función en la protección contra enfermedades autoinmunitarias. Además, la capacidad sorprendente de promover la actividad de linfocitos T no convencionales proporciona mayor potencia a los efectos antitumorales de los anticuerpos.
- 15 También se describe un método *in vitro* para reducir selectivamente los linfocitos Treg de una población de linfocitos T, que comprende poner en contacto la población de linfocitos T con un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, por lo que el anticuerpo anti-TIGIT reduce selectivamente la población de linfocitos Treg.
- 20 En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que el método reduce selectivamente los linfocitos Treg de una población de linfocitos T, en el que el método comprende poner en contacto la población de linfocitos T con un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, por lo que el anticuerpo anti-TIGIT reduce selectivamente la población de linfocitos Treg. Como se demuestra en los ejemplos adjuntos, también se describen en el presente documento anticuerpos anti-TIGIT que no compiten con CD155/PVR por la unión a TIGIT. Los fragmentos Fab de los anticuerpos anti-TIGIT no competitivos con CD155 de acuerdo con la invención pueden mostrar una K_D por TIGIT medida por ForteBio™ en el intervalo de 5×10^{-9} a 5×10^{-8} M, opcionalmente de 1×10^{-8} a 3×10^{-8} M.
- 30 Un anticuerpo de la divulgación puede comprender un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en el que la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 280, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 281, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 282, y la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 292, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 293 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 294. El dominio variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 333 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 334 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 35 Cuando la secuencia de aminoácidos del dominio VH muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 333, no obstante, puede comprender CDR de la cadena pesada que son idénticas a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la SEQ ID NO: 333 (SEQ ID NO:280, 281 y 282, respectivamente), aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes. Asimismo, cuando la secuencia de aminoácidos del dominio VL muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 334, no obstante, puede comprender CDR de la cadena ligera que son idénticas a LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la SEQ ID NO: 334 (SEQ ID NO:292, 293 y 294, respectivamente), aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes.
- 40 Un anticuerpo de la divulgación puede comprender un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en el que la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 353, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 354, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 355, y la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 356, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 357 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 358. El dominio variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 367 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 368 o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 45 Cuando la secuencia de aminoácidos del dominio VH muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 367, no obstante, puede comprender CDR de la cadena pesada que son idénticas a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la SEQ ID NO: 367 (SEQ ID NO:353, 354 y 355, respectivamente), aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes. Asimismo, cuando la secuencia de aminoácidos del dominio VL muestra menos de un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 368, no obstante, puede comprender CDR de la cadena ligera que son idénticas a LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la SEQ ID NO: 368 (SEQ ID NO:356, 357 y 358, respectivamente), aunque mostrando variación de la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones flanqueantes.
- 50 65 POLINUCLEÓTIDOS, VECTORES Y SISTEMAS DE EXPRESIÓN

- La invención también proporciona moléculas polinucleotídicas que codifican los anticuerpos contra TIGIT de la invención, también vectores de expresión que contienen secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos contra TIGIT de la invención unidas de forma funcional a secuencias reguladoras que permiten la expresión del polipéptido de unión a antígeno en una célula hospedadora o sistema de expresión sin células, y una célula hospedadora o sistema de expresión sin células que contiene este sistema de expresión.
- 5 Las moléculas polinucleotídicas que codifican los anticuerpos contra TIGIT de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN recombinante. Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" o "molécula polinucleotídica" se usan en el presente documento indistintamente y se refieren a cualquier molécula de ADN o ARN, monocatenaria o bicatenaria y, si es monocatenaria, la molécula de su secuencia complementaria. En el análisis de las moléculas de ácido nucleico, una secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico particular puede describirse en el presente documento de acuerdo con la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección de 5' a 3'. En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos o polinucleótidos están "aislados". Este término, cuando se aplica a una molécula de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de secuencias con las que es inmediatamente contigua en el genoma de origen natural del organismo en que se origina. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o vector vírico, o integrada en el ADN genómico de una célula procariota o eucariota u organismo hospedador no humano. Cuando se aplica a ARN, la expresión "polinucleótido aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se define anteriormente. Como alternativa, 10 la expresión puede hacer referencia a una molécula de ARN que se ha purificado/separado de otros ácidos nucleicos con los que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un polinucleótido aislado (ya sea ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o 15 sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.
- 10 Para la producción recombinante de un anticuerpo contra TIGIT de acuerdo con la invención, puede prepararse un polinucleótido recombinante que lo codifica (usando técnicas convencionales de biología molecular) e insertarse en un vector replicable para su expresión en una célula hospedadora elegida, o un sistema de expresión sin células. Las células hospedadoras adecuadas pueden ser células procariotas, de levadura o eucariotas superiores, 20 específicamente células de mamífero. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-74, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980; o clones derivados de CHO como CHO-K1, ATCC CCL-61, 25 Kao y Puck, Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 60:1275-1281, 1968); células de Sertoli de ratón (TM4; Mather, Biol. Reprod. 23:243-252, 1980); células de mieloma de ratón SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) o NS0 (colecciones de cultivo HPA n.º 85110503); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervicouterino humano (HELA, ATCC CCL 2); 30 células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de glándula mamaria de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68, 1982); 35 células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2), así como la línea celular PERC-6 de DSM. Los vectores de expresión adecuados para su uso en cada una de estas células hospedadoras también son conocidos en general en la técnica.
- 40 45 Debe apreciarse que la expresión "célula hospedadora" en general se refiere a una línea celular cultivada. Los seres humanos completos en que se ha introducido un vector de expresión que codifica un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la invención se excluyen explícitamente de la definición de una "célula hospedadora".
- 50 En un aspecto importante, la invención también proporciona un método de producción de un anticuerpo contra TIGIT de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora (o sistema de expresión sin células) que contiene el polinucleótido (por ejemplo, un vector de expresión) que codifica el anticuerpo contra TIGIT en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo contra TIGIT, y recuperar el anticuerpo contra TIGIT expresado. Este proceso de expresión recombinante puede usarse para producción a gran escala de anticuerpos contra TIGIT de acuerdo 55 con la invención, incluyendo anticuerpos monoclonales destinados a uso terapéutico humano. Los vectores, líneas celulares y procesos de producción adecuados para fabricación a gran escala de anticuerpos recombinantes adecuados para uso terapéutico *in vivo* están disponibles en general en la técnica y serán conocidos por los expertos en la materia.
- 60 65 Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una combinación de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que (i) la HCDR1 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 16, la HCDR2 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 17, la HCDR3 comprende o consiste en la SEQ ID NO:18, la LCDR1 comprende o consiste en la SEQ ID NO:61, la LCDR2 comprende o consiste en la SEQ ID NO:62 y la LCDR3 comprende o consiste en la SEQ ID NO:63.

Adicionalmente, de acuerdo con la invención se proporciona un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones se proporciona un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo 31282 proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 Adicionalmente, de acuerdo con la invención se proporciona un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo anti-TIGIT, en el que el polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados comprende la SEQ ID NO: 251 y la SEQ ID NO: 252. En determinadas realizaciones donde el polinucleótido comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 251 y una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 252, las secuencias son contiguas. En determinadas realizaciones donde el polinucleótido comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 251 y una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 252, las secuencias no son contiguas.

10 Adicionalmente, de acuerdo con la invención se proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención unido de forma funcional a secuencias reguladoras que permitan la expresión del polipéptido de unión a antígeno en una célula hospedadora o sistema de expresión sin células.

15 Adicionalmente, de acuerdo con la invención se proporciona una célula hospedadora o sistema de expresión sin células que contiene un vector de expresión de acuerdo con la invención.

20 Adicionalmente, de acuerdo con la invención se proporciona un método de producción de un anticuerpo recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula hospedadora o sistema de expresión sin células de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno expresado.

25 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

30 También se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención formulado con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos contra TIGIT. Las técnicas para formular anticuerpos para uso terapéutico humano son bien conocidas en la técnica y se revisan, por ejemplo, en Wang *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pág. 1-26, 2007.

35 Los anticuerpos contra TIGIT y composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento tienen utilidad en tratamiento, en particular el tratamiento terapéutico de enfermedades, en particular afecciones que se benefician de la inhibición de la función de TIGIT.

PRODUCTOS DE COMBINACIÓN

40 Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son particularmente eficaces cuando se administran en combinación con inhibidores del punto de control inmunitario, específicamente anticuerpos antagonistas anti-ICOS o anticuerpos anti-PD-1 (es decir, anticuerpos antagonistas específicos para la molécula immunorreguladora humana PD-1). La administración de anticuerpos anti-TIGIT en combinación con un anticuerpo anti-ICOS o anti-PD-1 provoca una reducción sinérgica en el crecimiento del tumor en comparación con cualquier anticuerpo en solitario. Se espera observar efectos similares usando una combinación de un anticuerpo anti-TIGIT de acuerdo con la invención y un anticuerpo anti-PD-L1.

50 En el presente documento se demuestra además que los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son particularmente eficaces cuando se administran en combinación con un anticuerpo agonista específico para una molécula coestimuladora del punto de control inmunitario, específicamente anticuerpos agonistas anti-4-1BB, anti-OX40 o anti-GITR. La administración de anticuerpos anti-TIGIT en combinación con un anticuerpo anti-4-1BB, anti-OX40 o anti-GITR provoca una reducción sinérgica en el crecimiento del tumor en comparación con cualquier anticuerpo en solitario.

55 También se proporciona un producto de combinación que comprende un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y uno o más de un agente quimioterápico, un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-GITR y un anticuerpo anti-ICOS. El anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno puede ser un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno proporcionado de acuerdo con la invención. De acuerdo con la invención, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:

HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16 (YTFTSYMMH),
 HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
 HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
 LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),

LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), and
LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63 (QQYFSPPWT).

5 También se proporciona una combinación como se proporciona en el presente documento para su uso en un método de tratamiento del cáncer o infección vírica, opcionalmente en el que la infección vírica es infección por CMV. Se proporciona además una combinación como se proporciona en el presente documento para su uso en un método proporcionado en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, cuando se proporcionan dos o más agentes activos como una "combinación", "combinación terapéutica" o "politerapia" (los términos se usarse indistintamente), esto no requiere o excluye que los agentes activos se formulen en una sola composición. A una politerapia se le da su interpretación convencional de dos o más agentes activos a administrar de modo que el paciente pueda obtener un beneficio de cada agente. "Politerapia" no tiene que ser coformulación, coadministración, administración simultánea o formulación de dosis fija.

15 **MÉTODOS TERAPÉUTICOS**

20 Los anticuerpos contra TIGIT, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para inhibir el crecimiento de células tumorales cancerosas *in vivo* y, por lo tanto, son útiles en el tratamiento de tumores.

Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo contra TIGIT o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer en un paciente humano.

25 En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es para su uso en un método de reducción selectiva de linfocitos Treg en un paciente con cáncer, comprendiendo el método administrar un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo al paciente.

30 En determinadas realizaciones preferidas, el paciente a tratar tiene un cáncer seleccionado de: cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de mama, tumores cerebrales, leucemias crónicas o agudas incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no hodgkiniano, linfoma linfocítico, linfoma primario del SNC, linfoma de linfocitos B (por ejemplo, CLL), linfoma de linfocitos T (por ejemplo, síndrome de Sézary)), carcinomas nasofaríngeos, melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello (por ejemplo, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (HNSCC)), carcinoma cutáneo, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos infantiles, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), angiogénesis tumoral, tumor del eje vertebral, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer escamocelular, mesotelioma. En determinadas realizaciones, el cáncer inhibido es

35 cáncer pulmonar, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de riñón), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, HNSCC), o cáncer de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon). En determinadas realizaciones, el cáncer de colon (por ejemplo, adenocarcinoma de colon) o cáncer pulmonar. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer hemático. En determinadas realizaciones de este tipo, el cáncer es linfoma. En determinadas realizaciones, el cáncer es linfoma de linfocitos T o linfoma de linfocitos B.

40 50 En determinadas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende además la administración de un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente quimioterápico.

55 Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son particularmente eficaces cuando se administran en combinación con inhibidores del punto de control inmunitario, específicamente anticuerpos antagonistas anti-ICOS o anticuerpos anti-PD-1 (es decir, anticuerpos antagonistas específicos para la molécula inmunorreguladora humana PD-1). La administración de anticuerpos anti-TIGIT en combinación con un anticuerpo anti-ICOS o anti-PD-1 provoca una reducción sinérgica en el crecimiento del tumor en comparación con cualquier anticuerpo en solitario. Se espera observar efectos similares usando una combinación de un anticuerpo anti-TIGIT de acuerdo con la invención y un anticuerpo anti-PD-L1.

60 65 En el presente documento se demuestra además que los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son particularmente eficaces cuando se administran en combinación con un anticuerpo agonista específico para una molécula coestimuladora del punto de control inmunitario, específicamente anticuerpos agonistas anti-4-1BB, anti-OX40 o anti-GITR. La administración de anticuerpos anti-TIGIT en combinación con un anticuerpo anti-4-1BB, anti-OX40 o anti-GITR provoca una reducción sinérgica en el crecimiento del tumor en

comparación con cualquier anticuerpo en solitario.

Por lo tanto, también se proporciona en el presente documento un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención y también administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-GITR, o un anticuerpo anti-ICOS.

Además, los datos proporcionados en el presente documento que demuestran que los anticuerpos anti-TIGIT pueden aumentar la actividad de linfocitos $\gamma\delta$, así como de los linfocitos T convencionales indica que los anticuerpos anti-TIGIT pueden usarse para tratar afecciones distintas del cáncer. En particular, se sabe que los linfocitos T $\gamma\delta$ son importantes en la respuesta a infecciones, por ejemplo, infecciones bacteriana, fúngicas o víricas. Como se muestra en el ejemplo 29, cuando se ponen en contacto con un anticuerpo anti-TIGIT, los linfocitos T $\gamma\delta$ de sujetos seropositivos a CMV muestran activación notablemente aumentada, caracterizada por un aumento en la secreción de IFNg. La capacidad de promover la activación de linfocitos T $\gamma\delta$ en pacientes con CMV de esta manera indica que la administración de un anticuerpo anti-TIGIT promoverá la actividad antivírica de los linfocitos T $\gamma\delta$.

Por consiguiente, también se describe un método de tratamiento de infecciones víricas en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. También se describe un método de tratamiento de infecciones víricas en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento al sujeto, tratando de este modo la infección vírica. La infección vírica puede ser infección por CMV.

El método puede comprender además la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos pueden seleccionarse de: un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-GITR y un anticuerpo anti-ICOS.

Como se demuestra en los ejemplos, los anticuerpos anti-TIGIT divulgados en el presente documento son eficaces en promover la actividad de los linfocitos T, especialmente la actividad proinflamatoria de los linfocitos T. La actividad de los linfocitos T puede medirse por métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, midiendo la producción de IFNg como se describe en los ejemplos.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que el método promueve la actividad de los linfocitos T, comprendiendo el método poner en contacto una población de linfocitos T con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En determinadas realizaciones, el método promueve la actividad de los linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales. En determinadas realizaciones, el método promueve la actividad de los linfocitos T CD4. En determinadas realizaciones, el método promueve la actividad de los linfocitos T CD8. En determinadas realizaciones, el método promueve la actividad de los linfocitos T $\gamma\delta$ (gamma-delta).

También se describe en el presente documento un método *in vitro* para promover la actividad de los linfocitos T, que comprende poner en contacto una población de linfocitos T con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento.

Se demuestra además en los ejemplos que los anticuerpos anti-TIGIT divulgados en el presente documento serán especialmente eficaces en promover la actividad de los linfocitos T cuando se usen en combinación con un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-GITR o un anticuerpo anti-ICOS. De manera significativa, la combinación proporciona un aumento sinérgico (es decir, mayor que aditivo) en la actividad de los linfocitos T.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método para promover la actividad de los linfocitos T comprende además poner en contacto la población de linfocitos T con uno o más de: un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-GITR y un anticuerpo anti-ICOS.

La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de proteínas de unión al antígeno TIGIT

Se seleccionaron ABP TIGIT de una colección sintética de anticuerpos humanos expresados y presentados en la superficie de células de levadura en formato IgG en general como se describe, por ejemplo, en el documento WO2009036379; documento WO2010105256; documento WO2012009568; y Xu *et al.*, Protein Eng Des Sel., Vol.

26(10), pág. 663-670 (2013)), y más específicamente como se proporciona a continuación. Las secuencias y características de las ABP aisladas de la colección recombinante se proporcionan en las figuras 1 a 6.

5 Se propagaron ocho colecciones sintéticas humanas vírgenes en levadura cada una de $\sim 10^9$ de diversidad como se describe previamente (véase, por ejemplo: Xu *et al.*, 2013; documento WO2009036379; documento WO2010105256; y documento WO2012009568). Para las dos primeras rondas de selección, se realizó una técnica de clasificación de microesferas magnéticas utilizando el sistema Miltenyi MACS, como se describe (véase, por ejemplo, Siegel *et al.*, 2004). En resumen, se incubaron células de levadura ($\sim 10^{10}$ células/colección) con antígeno TIGIT-Fc biotinilado (Creative Biomart) en tampón de lavado FACS (solución salina tamponada con fosfato (PBS)/seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1 %). Después de lavar una vez con 50 ml de tampón de lavado enfriado en hielo, el sedimento celular se resuspendió en 40 ml de tampón de lavado, y se añadieron microesferas de estreptavidina (500 μ l) a las levaduras y se incubaron durante 15 min a 4 °C. A continuación, las levaduras se sedimentaron, se resuspendieron en 5 ml de tampón de lavado, y se cargaron en una columna Miltenyi LS. Después de cargar los 5 ml, la columna se lavó 3 veces con 3 ml de tampón de lavado FACS. La columna entonces se retiró del campo magnético, y las levaduras se eluyeron con 5 ml de medio de crecimiento y se dejaron crecer durante una noche. La siguientes rondas de clasificación se realizaron usando citometría de flujo. Se sedimentaron aproximadamente 1×10^8 levaduras, se lavaron tres veces con tampón de lavado, y se incubaron con antígeno de fusión TIGIT-Fc biotinilado (10 nM) en condiciones de equilibrio a temperatura ambiente. Las levaduras entonces se lavaron dos veces y se tiñeron con reactivos secundarios LC-FITC (diluido 1:100) y SA-633 (diluido 1:500) o EA-PE (diluido 1:50) durante 15 min a 4 °C. Después de lavar dos veces con tampón de lavado enfriado en hielo, los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,4 ml de tampón de lavado y se transfirieron a tubos de clasificación tapados con filtro. La clasificación se realizó usando un clasificador FACS ARIA (BD Biosciences) y las ventanas de clasificación se asignaron para seleccionar productos de unión específicos con respecto a un control de fondo. Las posteriores rondas de selección se emplearon para reducir el número de productos de unión no específicos utilizando proteínas de membrana solubles de células CHO (véase, por ejemplo, el documento WO2014179363 y Xu *et al.*, Protein Eng Des Sel, Vol. 26(10), pág. 663-670 (2013)), e identificar productos de unión con afinidad mejorada por TIGIT usando el antígeno TIGIT-Fc. Después de la ronda final de clasificación, las levaduras se sembraron en placa y se recogieron colonias individuales para su caracterización y para la designación de clones para la maduración de la afinidad. Se cribaron 63 clones por la actividad funcional. Del cribado, los clones 26518, 26452, 26486, 26521 y 26493 tenían la mejor actividad funcional y se seleccionaron para optimización adicional.

Ejemplo 2: Optimización de anticuerpos

35 La optimización de clones vírgenes se realizó utilizando tres estrategias de maduración: diversificación de la cadena ligera; diversificación de HCDR1 y HCDR2; y diversificación de HCDR3 dentro de las combinaciones de diversidad de HCDR1 y HCDR2 seleccionadas.

40 Diversificación de la cadena ligera: Se extrajeron las regiones variables de la cadena pesada de productos vírgenes (descritos anteriormente) y se transformaron en una colección de la cadena ligera con una diversidad de 1×10^6 . Las selecciones se realizaron como se describe anteriormente con una ronda de clasificación MACS y tres rondas de clasificación FACS usando antígeno TIGIT-HIS biotinilado 10 nM o 1 nM (Creative Biomart) para las rondas respectivas.

45 Selección de HCDR1 y HCDR2: Las HCDR3 de clones seleccionados del procedimiento de diversificación de la cadena ligera se recombinaron en una colección pregenerada con variantes de HCDR1 y HCDR2 de una diversidad de 1×10^8 y las selecciones se realizaron usando antígeno HIS-TIGIT monomérico. Se aplicaron presiones de afinidad usando concentraciones decrecientes de antígeno HIS-TIGIT biotinilado (de 100 a 1 nM) en condiciones de equilibrio a temperatura ambiente.

50 Selecciones de HCDR3/HCDR1/HCDR2: Se solicitaron de IDT oligos que comprendían la HCDR3, así como una región flanqueante homóloga en cualquier caldo de la HCDR3. Las posiciones de los aminoácidos en la HCDR3 se variaron mediante diversidad NNK en dos posiciones por oligo por toda la HCDR3. Los oligos de HCDR3 se hicieron bicatenarios usando cebadores que hibridaban con la región flanqueante de la HCDR3. La FWR1 a la FWR3 restantes de la región variable de la cadena pesada se amplificaron a partir de combinaciones de anticuerpos con afinidad mejorada que se aislaron de las diversidades de HCDR1 y HCDR2 seleccionadas anteriormente. La colección entonces se creó transformando el oligo de HCDR3 bicatenario, los fragmentos FWR1 a FWR3 combinados, y el vector de expresión de la cadena pesada en levaduras que ya contenían la cadena ligera del precursor virgen original. Las selecciones se realizaron como durante los ciclos previos usando clasificación FACS para cuatro rondas. Por cada ronda de FACS, las colecciones se evaluaron para la unión a PSR, la reactividad cruzada de especie y la presión de afinidad, y se realizó la clasificación para obtener poblaciones con las características deseadas. Las presiones de afinidad para estas selecciones se realizaron como se describe anteriormente en la selección de HCDR1 y HCDR2.

Ejemplo 3: Producción y purificación de anticuerpos

65

A. Producción en levaduras

Para producir cantidades suficientes de anticuerpos seleccionados optimizados y no optimizados para caracterización adicional, se hicieron crecer clones de levadura hasta la saturación y, entonces, se indujeron durante 48 h a 30 °C con agitación. Después de la inducción, las células de levadura se sedimentaron y los sobrenadantes se recogieron para la purificación. Se purificaron IgG usando columna de proteína A y se eluyeron con ácido acético, pH 2,0. Se generaron fragmentos Fab por digestión con papaína y se purificaron en un proceso de dos etapas sobre proteína A (GE LifeSciences) y KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

B. Producción en células de mamífero

Para producir cantidades suficientes de anticuerpos seleccionados optimizados y no optimizados para caracterización adicional, se generaron vectores de ADN que codificaban los clones de anticuerpo específicos y se transdijeron en células HEK. Los fragmentos de ADN sintéticos optimizados para los codones humanos para dominios variables de anticuerpo se solicitaron a Geneart. Las secuencias del dominio variable se ligaron sin problemas en vectores de expresión pUPE que contenían la secuencia señal de IgKappa de ratón y regiones constantes de la clase de anticuerpo respectiva. Los vectores de expresión se verificaron por análisis de restricción y secuenciación de ADN. Para la transfección transitoria, se produjeron maxipreps de ADN sin endotoxinas (Sigma) y los vectores de la cadena pesada y ligera se cotransfектaron en células HEK293EBNA1, en medio Freestyle (ThermoFisherScientific), de acuerdo con protocolos establecidos. Se añadió Primatone (0,55 % de volumen final) 24 horas después de la transfección. El medio acondicionado se recogió 6 días después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron por lotes mediante cromatografía de afinidad Mabselect sureLX (GE Healthcare). Los anticuerpos unidos se lavaron en 2 etapas con PBS que contenía NaCl 1 M y PBS. Los anticuerpos se eluyeron con citrato 20 mM, NaCl 150 mM pH 3 y se neutralizaron hasta aproximadamente pH 7 con 1/6 del volumen de K2HPO4/KH2PO4 1 M pH 8.

A continuación, los anticuerpos se purificaron adicionalmente por filtración en gel usando una columna Superdex200, equilibrada en PBS. Las fracciones se analizaron por NuPAGE y las fracciones que contenían anticuerpo se combinaron. Los productos finales se esterilizaron sobre un filtro de jeringa de 0,22 µM. El producto se analizó por NuPAGE y se midieron los niveles de endotoxina por ensayo LAL.

Ejemplo 4: Determinación de la afinidad para la unión de anticuerpos anti-TIGIT a proteína TIGIT humana recombinante

A. Mediciones de K_D ForteBio

Las mediciones de afinidad ForteBio de anticuerpos seleccionados se realizaron en general como se describe previamente (véase, por ejemplo, Estep *et al.*, Mabs, Vol. 5(2), pág. 270-278 (2013)). En resumen, las mediciones de afinidad ForteBio se realizaron cargando IgG en línea en detectores AHQ. Los detectores se equilibraron fuera de línea en tampón de ensayo durante 30 min y después se controlaron en línea durante 60 segundos para el establecimiento basal. Los detectores con IgG cargadas se expusieron a antígeno 100 nM (TIGIT humano-Fc, TIGIT humano-His o TIGIT de macaco-Fc) durante 5 minutos, después de ello, se transfirieron a tampón de ensayo durante 5 min para la medición la velocidad de disociación. La cinética se analizó usando el modelo de unión 1:1. Se ensayaron más de 90 anticuerpos para la afinidad por ForteBio y la tabla 3 proporciona datos para 15 anticuerpos anti-TIGIT seleccionados que demuestran fuerte unión a proteína TIGIT recombinante.

B. Mediciones de K_D MSD-SET

Las mediciones de afinidad en equilibrio de anticuerpos seleccionados se realizaron en general como se describe previamente (Estep *et al.*, Mabs, Vol. 5(2), pág. 270-278 (2013)). En resumen, se realizaron valoraciones en equilibrio en solución (SET) en PBS + BSA sin IgG al 0,1 % (PBSF) con antígeno (monómero TIGIT-His) mantenido constante a 10-100 pM y se incubaron con diluciones en serie de factor 3 a 5 de Fab o mAb partiendo a 10 pM-10 nM. Los anticuerpos (20 nM en PBS) se recubrieron sobre placas MSD-ECL de unión convencionales durante una noche a 4 °C o a temperatura ambiente durante 30 min. Las placas entonces se bloquearon mediante BSA durante 30 min con agitación a 700 rpm, seguido de tres lavados con tampón de lavado (PBSF + Tween 20 al 0,05 %). Las muestras SET se aplicaron e incubaron en las placas durante 150 s con agitación a 700 rpm seguido de un lavado. El antígeno capturado en una placa se detectó con 250 ng/ml de estreptavidina marcada con SulfoTag en PBSF mediante incubación en la placa durante 3 min. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y después se leyeron en el instrumento MSD Sector Imager 2400 usando un tampón de lectura T 1x con tensioactivo. El porcentaje de antígeno libre se representó como una función del anticuerpo valorado en Prism y se ajustó a una ecuación cuadrática para extraer la K_D . Para mejorar el rendimiento, se usaron robots de manipulación de líquidos en todos los experimentos MSD-SET, incluyendo la preparación de muestras SET. Los anticuerpos seleccionados se ensayaron para la afinidad por MSD y la tabla 4 proporciona datos para 7 clones anti-TIGIT que demuestran fuerte unión a proteína TIGIT recombinante.

Tabla 4: Análisis MSD de la afinidad para anticuerpos anti-TIGIT seleccionados

Clon	Afinidad MSD KD monovalente (M) TIGIT humano-His
29489	1,1E-10
29494	7,0E-11
29499	1,9E-11
29513	2,5E-11
29520	2,1E-10
29523	1,7E-09
29527	6,4E-10

C. Medición Biacore

5 Se realizó análisis con biodetector a 25 °C en un sistema de tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %) usando un biodetector óptico Biacore 8K acoplado con un chip detector CM5 (GE Healthcare, Marlboro, MA). El alojamiento de la muestra se mantuvo a 8 °C. Se inmovilizó anticuerpo de cabra de captura anti-IgG humana (específico del fragmento Fcγ, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West 10 Grove, PA; 109-005-098) (11700 +/- 200 UR) en ambas cubetas de lectura del chip detector usando química de acoplamiento amina convencional. Este tipo de superficie proporcionó un formato para capturar de forma reproducible anticuerpo de análisis reciente después de cada etapa de regeneración. La cubeta de lectura 2 se usó para analizar el anticuerpo capturado (60-90 UR) mientras que la cubeta de lectura 1 se usó como cubeta de lectura de referencia. Se prepararon concentraciones de antígeno que variaban de 30 a 0,123 nM (diluciones de factor 3) en 15 tampón de migración. Cada una de las concentraciones de muestra de antígeno se procesó como una sola réplica. También se procesaron dos inyecciones de blanco (tampón) y se usaron para evaluar y sustraer los artefactos del sistema. Las fases de asociación (300 s) y disociación (600 s) para todas las concentraciones de antígeno se realizaron a un caudal de 30 ul/min. La superficie se regeneró con tres inyecciones secuenciales (15 s, 15 s y 60 s) de glicina 10 mM, pH 1,5 a un caudal de 30 ul/min. Los datos se alinearon, se sometieron a doble referencia y se 20 ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático de evaluación Biacore 8K, versión 1.0. Los anticuerpos seleccionados se ensayaron para la afinidad por Biacore y la tabla 5 proporciona datos para 5 clones anti-TIGIT que demuestran fuerte unión a proteína TIGIT recombinante.

Tabla 5: Análisis Biacore de la afinidad para anticuerpos anti-TIGIT seleccionados

Clon	Biacore: KD monovalente (M) (IgG en chip CM5, TIGIT humano-HIS en solución (Concentración de partida 25 nM, dilución 3x)
29489	2,48E-10
31282	2,94E-10
29494	2,70E-10
29520	7,16E-10
29527	1,20E-09
31288	1,92E-10

Ejemplo 5: Ensayo de competición entre anticuerpos antagonistas anti-TIGIT y ligandos naturales de TIGIT**A. Recopilación de epítopo/bloqueo de ligando Octet Red384**

30 La recopilación de epítopo/bloqueo de ligando de los anticuerpos seleccionados se realizó usando un ensayo de bloqueo cruzado en formato emparedado convencional. La IgG de control anti-diana se cargó en detectores AHQ y los sitios de unión a Fc no ocupados en el detector se bloquearon con un anticuerpo IgG1 humana irrelevante. Los detectores entonces se expusieron a antígeno diana 100 nM (hTIGIT, Creative Biomart) seguido de un segundo

anticuerpo anti-diana o ligando (anticuerpo anti-TIGIT y CD155 o CD113 o CD112). Los datos se procesaron usando el programa informático de análisis de datos de ForteBio 7.0. La unión adicional por el segundo anticuerpo o ligando después de la asociación del antígeno indica un epítopo no ocupado (no competidor), mientras que ausencia de unión indica bloqueo del epítopo (competidor o bloqueo de ligando). Los anticuerpos precursores (antes de la optimización) se ensayaron para la competición con ligandos naturales y la tabla 6 resume los datos obtenidos para la competición frente a CD155, CD112 y CD113. Se descubrió que el clon precursor 26432 no competía con CD155 por la unión a TIGIT. Todos los otros anticuerpos anti-TIGIT seleccionados compiten con el ligando natural por la unión a la proteína TIGIT humana recombinante.

10 **Tabla 6: Análisis de recopilación frente a ligandos naturales de TIGIT para anticuerpos anti-TIGIT no optimizados**

Clon	competición con CD155	competición con CD112	competición con CD113
26518	Sí	Sí	Sí
26452	Sí	Sí	Sí
26486	Sí	Sí	Sí
26521	Sí	Sí	Sí
26493	Sí	Sí	Sí
26432	No		

B. Competición de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT con CD155 en Jurkat-hTIGIT

15 Se recogieron células Jurkat que sobreexpresaban TIGIT humano (Jurkat-hTIGIT) y se distribuyeron a 10^5 células/pocillo y se incubaron con anticuerpos anti-TIGIT humano a las siguientes concentraciones: 166,6; 53,24; 17,01; 5,43; 1,73; 0,55; 0,17; 0,05; 0,01; $5,78 \times 10^{-3}$; $1,85 \times 10^{-3}$; $5,9 \times 10^{-3}$ nM en medio completo durante 45 min a 37 °C. Se lavó el exceso de anticuerpo, y después las células se incubaron con CD155-His a 5 µg/ml (Creative Biomart, PVR-3141H) durante 45 min a 37 °C. Entonces, se detectó CD155-His unido usando anti-marca de His-PE (Biolegend, 362603, a 2 µl por ensayo), incubado durante 30 min a 4 °C. Las células se analizaron por FACS usando BD LSRLFortessa y la mitad de la concentración (IC_{50}) que evita la unión de CD155 se calculó basándose en la media geométrica de la fluorescencia.

20 25 Los resultados fueron los siguientes: 0,101 nM para el clon 29489; 0,07 nM para el clon 29494; 0,102 nM para el clon 29520 y 0,078 nM para el clon 29527, para los resultados ilustrados en la figura 7. Los valores de otros anticuerpos ensayados se resumen en la tabla 7 a continuación. En general, los resultados demuestran una fuerte competición por los anticuerpos antagonistas anti-TIGIT ensayados con CD155 por la unión a TIGIT expresado en membrana.

30 **Tabla 7: Datos de IC_{50} para la competición de CD155 en TIGIT humano**

Clon	IC_{50} de competición de CD155 por la unión a TIGIT (en nM)
29489	0,101
29494	0,070
29499	0,103
29513	0,094
29520	0,102
29523	0,079
29527	0,078

Ejemplo 6: Caracterización de cromatografía de interacción hidrófoba (MAbs. 2015 May-Jun; 7(3):553-561.)

35 40 Se intercambió el tampón de muestras de anticuerpo IgG1 anti-TIGIT a sulfato de amonio 1 M y fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,5 usando una columna de centrifugación Zeba de 40 kDa de 0,5 ml (Thermo Pierce, cat. n.º 87766). Se estableció un gradiente salino en una columna Dionex ProPac HIC-10 desde sulfato de amonio 1,8 M, fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,5 hasta la misma condición sin sulfato de amonio. El gradiente migró durante 17 min a un caudal de 0,75 ml/min. Se añadió una etapa de lavado con acetonitrilo al final de la migración para eliminar cualquier

proteína restante y la columna se volvió a equilibrar sobre 7 volúmenes de columna antes del siguiente ciclo de inyección. Los tiempos de retención de los picos se controlaron a absorbancia A280 y las concentraciones de sulfato de amonio en la elución se calcularon basándose en el gradiente y el caudal. La tabla 8 resume los resultados obtenidos para 15 anticuerpos anti-TIGIT seleccionados.

5

Tabla 8: Análisis de cromatografía de interacción hidrófoba para anticuerpos anti-TIGIT seleccionados

Clon	Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) Tiempo de retención (min)
26518	10,4
29478	12,7
26452	9,3
29487	9,9
29489	10,6
26486	11,0
29494	9,7
29499	9,1
26521	12,4
29513	12,5
26493	8,8
29520	9,6
29523	8,7
29527	8,6
26432	11,1
32919	9,0
32931	9,3
32959	12,0

Ejemplo 7: Caracterización de reactivo de poliespecificidad de preparación PSR

10

A. Preparación de reactivo de poliespecificidad:

Se preparó reactivo de poliespecificidad (PSR) de acuerdo con Xu *et al.*, *mAbs* 2013. En resumen, se usaron 2,5 litros de células CHO-S como material de partida. Las células se sedimentaron a 2400 x g durante 5 min en frascos de centrífuga de 500 ml llenados hasta 400 ml. Los sedimentos celulares se combinaron y después se resuspendieron en 25 ml de tampón B y se sedimentaron a 2400 x g durante 3 min. El tampón se decantó y se repitió el lavado una vez. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 3x el volumen del sedimento de tampón B que contenía inhibidores de proteasa 1 x (Roche, cComplete, sin EDTA) usando un homogeneizador Polytron con las células mantenidas en hielo. El homogeneizado entonces se centrifugó a 2400 x g durante 5 min y el sobrenadante se retuvo y se sedimentó una vez adicional (2400 x g/5 min) para garantizar la eliminación de las células sin romper, los desechos celulares y los núcleos; el sobrenadante resultante es la preparación de proteínas totales. El sobrenadante entonces se transfirió a dos nuevos tubos de centrífuga Nalgene Oak Ridge de 45 ml y se sedimentó a 40 000 x g durante 40 min a 4 °C. Los sobrenadantes que contenían las proteínas citosólicas separadas (Separated Cytosolic Proteins - SCP) se transfirieron entonces a tubos Oak Ridge limpios, y se centrifugaron a 40 000 x g una vez más. En paralelo, los sedimentos que contenían la fracción de membrana (EMF) se retuvieron y se centrifugaron a 40 000 durante 20 min para eliminar el sobrenadante residual. Los sedimentos de EMF entonces se aclararon con tampón B. Entonces se añadieron 8 ml de tampón B a los sedimentos de membrana para desplazar los sedimentos y transferirlos a un homogeneizador Dounce. Después de homogeneizar los sedimentos, se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml y se representó la preparación de EMF final.

20

Mil millones de células de mamífero (por ejemplo, CHO, HEK293, Sf9) a $\sim 10^6$ - 10^7 células/ml se transfirieron del

entorno de histocultivo en 4x tubos cónicos de 250 ml y se sedimentaron a 550 x g durante 3 min. Todas las etapas posteriores se realizaron a 4 °C o en hielo con tampones enfriados en hielo. Las células se lavaron con 100 ml de PBSF (PBS 1x + 1 mg/ml de BSA) y se combinaron en un tubo cónico. Después de retirar el sobrenadante, el sedimento celular entonces se resuspendió en 30 ml de tampón B (HEPES 50 mM, NaCl 0,15 M, CaCl2 2 mM, KCl

5 5 mM, MgCl2 5 mM, glicerol al 10 %, pH 7,2) y se sedimentó a 550 x g durante 3 min. El sobrenadante de tampón B se decantó y las células se resuspendieron en 3x el volumen de sedimento de tampón B más inhibidor de proteasa 2,5x (Roche, cOmplete, sin EDTA). Los inhibidores de proteasa en el tampón B se incluyeron de aquí en adelante. Las células se homogeneizaron cuatro veces durante impulsos de 30 segundos (homogeneizador Polytron, 10 PT1200E) y la fracción de membrana se sedimentó a 40 000 x g durante 1 hora a 4 C. El sedimento se aclaró con 1 ml de tampón B; el sobrenadante se retiene y representa la s. El sedimento se transfiere a un homogeneizador Dounce con 3 ml de tampón B y se resuspende moviendo la mano de mortero lentamente arriba y abajo durante 30-35 pasadas. La fracción de membrana enriquecida (EMF) se mueve a un nuevo tubo de recogida, aclarando la mano de mortero para recoger toda la posible proteína. Se determina la concentración de proteína de la EMF purificada usando el kit de ensayo de proteína Dc (BioRad). Para solubilizar la EMF, se transfiere a tampón de solubilización 15 (HEPES 50 mM, NaCl 0,15 M, CaCl2 2 mM, KCl 5 mM, MgCl2 5 mM, n-dodecil-b-D-maltopiranósido (DDM) al 1 %, inhibidor de proteasa 1x, pH 7,2) hasta una concentración final de 1 mg/ml. Se rota la mezcla durante una noche a 4 °C estando seguida la rotación de centrifugación en un tubo Oak Ridge de 50 ml (Fisher Scientific, 050529-ID) a 40 000 x g durante 1 hora. El sobrenadante, que representa las proteínas de membrana solubles (SMP), se recogió y se cuantificó la producción de proteína como se describe anteriormente.

20 Para la biotinilación, se prepara la solución madre de NHS-LC-biotina de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pierce, Thermo Fisher). En resumen, se añaden 20 ul de reactivo biotina por cada 1 mg de muestra de EMF y se incuban a 4 °C durante 3 horas con agitación suave. Se ajusta el volumen hasta 25 ml con tampón B y se transfiere a un tubo de centrífuga Oak Ridge. Se sedimenta la EMF biotinilada (b-EMF) a 40 000 x g durante 1 hora, y se aclara dos veces con 3 ml de tampón C (tampón B menos el glicerol) sin alterar el sedimento. Se retira la solución residual. El sedimento se resuspendió con un homogeneizador Dounce en 3 ml de tampón C como se describe previamente. El sedimento resuspendido ahora representa EMF biotinilada (b-EMF) y se solubiliza como se describe anteriormente para preparar b-SMP.

30 *B. Análisis de unión de PSR*

Los análisis de PSR se realizaron en general como se describe en el documento WO2014/179363. En resumen, para caracterizar el perfil de PSR de los anticuerpos monoclonales presentados en levaduras, se transfirieron dos millones de levaduras presentadoras de IgG a una placa de ensayo de 96 pocillos y se sedimentaron a 3000 x g durante 3 min para eliminar el sobrenadante. Se resuspende el sedimento en 50 ul de dilución 1:10 recién preparada de b-PSR de reserva y se incuba en hielo durante 20 minutos. Se lavan las células dos veces con 200 ul de PBSF frío y el sedimento se resuspende en 50 ul de mezcla de marcaje secundaria (extravidina-R-PE, anti-LC humana-FITC, y yoduro de propidio). Se incuba la mezcla en hielo durante 20 minutos seguido de dos lavados con 200 ul de PBSF enfriado en hielo. Se resuspenden las células en 100 ul de PBSF enfriado en hielo y se procesa la placa en un 35 FACS Canto (BD Biosciences) usando inyector de muestras HTS. Los datos de citometría de flujo se analizaron para la intensidad media de fluorescencia en el canal R-PE y se normalizaron a los controles apropiados para evaluar la unión no específica. La tabla 9 resume los resultados de unión de reactivo de poliespecificidad obtenidos para 15 anticuerpos anti-TIGIT seleccionados, que confirman la baja puntuación para la mayoría de los clones.

40 45 **Tabla 9: Análisis de reactivo de poliespecificidad**

Clon	Puntuación (0-1) de reactivo de poliespecificidad (PSR)
26518	0,00
29478	0,01
26452	0,00
29487	0,01
29489	0,01
26486	0,00
29494	0,00
29499	0,10
26521	0,00
29513	0,01

(continuación)

Clon	Puntuación (0-1) de reactivo de poliespecificidad (PSR)
26493	0,00
29520	0,32
29523	0,12
29527	0,12
26432	0,00
31288	0,00
32919	0,00
32931	0,00
32959	0,1

Ejemplo 8: Caracterización de la expresión de TIGIT en poblaciones inmunitarias de PBMC humanos sanos5 **A. Perfil de expresión de TIGIT en subconjuntos de linfocitos T**

Se realizaron análisis de citometría de flujo para evaluar la expresión de TIGIT sobre subconjuntos de inmunocitos en PBMC recién aislados de individuos sanos. Los anticuerpos conjugados se adquirieron de Ebioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend o BD Biosciences. Las células se tiñeron según las instrucciones del fabricante usando 10 tampón FACS filtrado (PBS + EDTA 2 mM + BSA al 0,1 %) y tampón de tinción brillante (BD n.º 563794). Las células se bloquearon con FcBlock humano apropiado (BD n.º 564220) antes de la tinción y se fijaron usando tampón de fijación IC (eBioscience n.º 00-8222-49) antes de la adquisición. La adquisición se realizó en un FACS Fortessa (BD Biosciences) y se analizó con el programa informático FlowJo (FlowJo, LLC). Las células viables se seleccionaron en dispersión directa y lateral. Se seleccionaron diversos subconjuntos de inmunocitos de la siguiente manera: CD19+ (linfocitos B), CD3- CD19- CD14+ (monocitos), CD3+ TCRab- (linfocitos T TCRgd), CD3+ TCRab+ (linfocitos T TCRab), CD3- CD19- CD14+ HLA-DR- CD56^{bajo/altos} (linfocitos NK), CD3- CD19- CD14+ HLA-DR+ (células dendríticas), CD3+ TCRab+ CD4+ CD127^{bajo} CD25+ (linfocitos T reguladores), CD3+ TCRab+ CD4+ o CD8+ CD45RO+ CCR7+ (linfocitos T vírgenes CD4 o CD8), CD3+ TCRab+ CD4+ o CD8+ CD45RO+ (linfocitos T de memoria) y CD45RO- CD62L- (linfocitos T efectores).
20
Como se muestra en la figura 8A y 8B, TIGIT se expresa preferentemente en linfocitos NK, linfocitos T reguladores y linfocitos T de memoria CD8. Está presente a un menor grado en otros subconjuntos de linfocitos T con una baja proporción de linfocitos T vírgenes que muestran expresión de TIGIT. Además, TIGIT no se expresa en monocitos, células dendríticas y linfocitos B (figura 8B). Este conjunto de datos está de acuerdo con los datos publicados (Yu et al. NI 2008 y Wang et al. EJI 2015).
25

Ejemplo 9: Unión celular de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT30 **A. Unión de anticuerpos anti-TIGIT a Jurkat-hTIGIT y Jurkat-mTIGIT**

Se ha medido la afinidad de anticuerpos humanos anti-TIGIT usando células Jurkat E6.1 transducidas con TIGIT humano (Jurkat hTIGIT) o TIGIT de ratón (Jurkat-mTIGIT). Para analizar la afinidad de los anticuerpos seleccionados por hTIGIT o mTIGIT, se distribuyeron 10^5 células por pocillo y se incubaron con anticuerpo anti-TIGIT a una sola dosis de 100 nM (tabla 3) o con concentración decreciente (166,6 ; 53,24; 17,01; 5,43; 1,73; 0,55; 0,17; 0,05; 0,01; 5,78x10⁻³; 1,85x10⁻³; 5,9x10⁻³ nM) de anticuerpos seleccionados (figura 9). Los anticuerpos se incubaron con las células durante 20 min a 4 °C en tampón FACS. Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-Ig humano (específico de Fc gamma)-PE (eBioscience, 12-4998-82, a 2,5 µg/ml) durante 20 min en hielo y se lavaron dos veces. Se analizó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia usando LSR BD Fortessa. La unión celular se registró como la mediana de la intensidad de fluorescencia de PE en la línea transfectada en comparación con la línea no transfectada para cada anticuerpo (tabla 3). Para el cálculo de la CE_{50} de unión, la mitad de la concentración máxima de unión (CE_{50}) a hTIGIT-Jurkat se calculó usando una ecuación de ajuste a curva de cuatro variables en Prism, y los valores obtenidos fueron los siguientes: 0,082 nM para el clon 29489; 0,07 nM para el clon 29494; 0,119 nM para el clon 29520 y 0,05 nM para el clon 29527 para los datos ilustrados en la figura 9. Los resultados demuestran una fuerte unión a TIGIT humano expresado en membrana para los anticuerpos anti-TIGIT ensayados.
45

B. Unión de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT a linfocitos T primarios humanos

Se analizaron PBMC humanos aislados de voluntarios sanos para la unión por anticuerpos antagonistas anti-TIGIT. Las células se distribuyeron a 5×10^5 células por pocillo. Las células se incubaron con anticuerpo anti-CD16 (clon 3G8, BioLegend 302002), CD32 (clon FL18.26, BD Bioscience 557333) y CD64 (BD Bioscience 555525) a temperatura ambiente durante 10 min, y los anticuerpos anti-TIGIT humano indicados se añadieron directamente a una concentración final de: 12,65; 4; 1,26; 0,40; 0,126; 0,040; 0,12 y 4×10^3 nM en tampón FACS y se incubaron durante 20 min a 4 °C. Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-Ig humano (específico de Fc gamma)-PE (eBioscience, 12-4998-82, a 2,5 µg/ml) durante 20 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos y mezcla de LVD para los resultados de la figura 10A y 10B: anti-CD4-PercP-Cy5.5 (clon A161A1, BioLegend 357414); anti-CD8-BV510 (clon SK1, BD Bioscience 563919) y LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). Para la figura 10C, las células se lavaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos y mezcla de LVD: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), anti-TCRab-PercP-Cy5.5 (clon IP26, Biolegend 306723), anti-CD4-BV510 (clon SK3, BD Horizon 562970), anti-CD8-APC-Cy7 (clon SK1, Biolegend 344714), anti-CD25-BV605 (clon 2A3, Biolegend 562660), anti-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), anti-CCR7-BV421 (clon G043H7, Biolegend 353207) y anti-CD45RO-PE-Cy7 (clon UCHL1, Biolegend 304229).

El valor de CE_{50} para la unión a linfocitos T primarios humanos CD8+ se calculó usando el % de células teñidas positivas para TIGIT en linfocitos T LVD⁻CD8+ seleccionados (figura 10A y 10B). El valor de CE_{50} para la unión a linfocitos T CD8+ de memoria o primarios Treg humanos se calculó usando el % de células teñidas positivas para TIGIT en linfocitos T LVD⁻TCRab+CD45RO+CD8+ seleccionados (para linfocitos T CD8+ de memoria) o en linfocitos T LVD TCRab+CD127^{bajo}CD25^{alto}CD4+ seleccionados (para Treg) y se ilustran en la figura 10C.

Como se muestra en la figura 10A, el valor de CE_{50} para la unión a linfocitos T CD8+ humanos totales es 0,123 nM para el clon 29489; 0,181 nM, para el clon 29520 y 0,253 nM para el clon 29527. Se realizó la comparación directa entre 29489 y 31282 (el mutante 29489 con una mutación M a T en el residuo 116), y el valor de CE_{50} fue 0,057 nM y 0,086 nM respectivamente, lo que demuestra eficacia de unión fuerte y similar a linfocitos T CD8+ primarios humanos para los 2 clones (figura 10B). Los valores de CE_{50} obtenidos para la unión a linfocitos T CD8+ de memoria y Treg fueron 0,039 nM y 0,03 nM respectivamente, lo que demuestra una afinidad fuerte y similar por ambas poblaciones (figura 10C).

30 C. Unión de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT a linfocitos T primarios de macaco

Se obtuvieron PBMC aislados de *Macaca fascicularis* de BioPRIM. Las células se descongelaron y estimularon usando el kit de activación/expansión de linfocitos T para primate no humano (Miltenyi Biotec) a 1:2 (relación de microesferas:células) siguiendo las especificaciones del fabricante. Al día siguiente, se recogieron las células, se contaron y se distribuyeron a 5×10^4 células por pocillo. Las células se incubaron con anticuerpo anti-CD16 (clon 3G8, BioLegend 302002), CD32 (clon FL18.26, BD Bioscience 557333) y CD64 (BD Bioscience 555525) a temperatura ambiente durante 10 min, y los anticuerpos anti-TIGIT humano seleccionados se añadieron directamente a una concentración final de: 12,65; 4; 1,26; 0,40; 0,126; 0,040; 0,12 y 4×10^3 nM en tampón FACS y se incubaron durante 20 min a 4 °C. Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-Ig humano (específico de Fc gamma)-PE (eBioscience, 12-4998-82, a 2,5 µg/ml) durante 20 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos y mezcla de LVD para los datos ilustrados en la figura 11A y 11B: anti-CD4-PercP-Cy5.5 (clon A161A1, BioLegend 357414); anti-CD8-BV510 (clon SK1, BD Bioscience 563919), CD69-APC-Cy7 (clon FN50, BioLegend, 310914) y LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). Las células teñidas se analizaron por FACS usando BD LSR Fortessa. El valor de CE_{50} de unión se calculó usando el % de células teñidas positivas para TIGIT seleccionadas en linfocitos T LVD⁻CD69+CD8+. Como se muestra en la figura 11, los valores de CE_{50} para la unión a linfocitos T CD8+ de macaco fueron 0,487 nM para el clon 29489, 1,73 nM para el clon 29520 y 0,378 nM para el clon 29527. Los clones 29489 y 31282 (el mutante 29489 con una mutación de M a T en el residuo 116) se compararon también, y los valores de CE_{50} fueron 0,25 nM y 0,26 nM respectivamente para el ejemplo mostrado en la figura 11B, lo que demuestra una afinidad similar y fuerte por linfocitos T CD8+ primarios de macaco para los 2 clones.

Ejemplo 10: Caracterización funcional *in vitro* de actividad antagonista anti-TIGIT

A. Bioensayo de TIGIT en cocultivo de CHO-TCR-CD155 y Jurkat-hTIGIT

Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT humano, se cocultivaron células Jurkat, que expresan hTIGIT y un indicador de luciferasa activado tras acoplamiento de TCR (células Thaw-and-Use TIGIT Effector de Promega), con la línea celular CHO-K1 manipulada para que exprese CD155 humano y activador de TCR (Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 de Promega). La activación de células Jurkat que sobreexpresan TIGIT puede inducirse por contacto con células CHO-K1 que expresan CD155 tras acoplamiento de TCR en células Jurkat y puede aumentarse en presencia de anticuerpo antagonista anti-TIGIT. Para comparar la potencia de los diferentes anticuerpos para aumentar la activación de células Jurkat, el experimento se realizó en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo y se calcularon los valores de CE_{50} .

Se sembraron células Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 37 °C, incubadora de CO2 al 5 % O/N. El día siguiente, se

añadieron células Thaw-and-Use TIGIT Effector (Promega, CS198811) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante a las placas de células CD155 aAPC/CHO-K1 que contenían medio completo reciente con anticuerpo anti-TIGIT a 133 nM (figura 12A) o concentraciones crecientes (0,22; 0,54; 1,36; 3,41; 8,53; 21,3; 53,3; 133,33; y 333 nM) de anticuerpo anti-TIGIT (figura 12B) y se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 6 horas.

- 5 Despues de las 6 horas de incubación, se evaluó la activación de las células TIGIT Effector midiendo la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa Bio-GloTM (Promega, G7941).
- 10 La figura 12A muestra el efecto de la adición de los clones seleccionados sobre la señal de luciferasa en comparación con el control de isotipo. Los datos demuestran la actividad antagonista de los anticuerpos que provocaban una activación más fuerte de células Jurkat-hTIGIT. La tabla 10 resumen el cambio factorial de inducción en la expresión de luciferasa obtenido para los diferentes anticuerpos anti-TIGIT sobre el clon de control de isotipo (03847).
- 15 **Tabla 10: Cambio factorial de inducción sobre el control de isotipo**

Nombre del clon	Inducción sobre el control de isotipo (cambio factorial)
26518	2,89
29478	3,57
26452	2,9
29487	3,22
29489	4,08
26486	1,9
29494	3,42
29499	3,68
26521	2,66
29513	3,26
26493	0,96
29520	2,52
29523	2,4
29527	2,96
03847	1

- 20 Como se muestra en la figura 12B, se evaluó la activación de células Jurkat-hTIGIT con anticuerpo anti-TIGIT entre 0,22 nM y 333 nM y dieron un valor de CE_{50} de 3,0 nM para el clon 29489; 4,4 nM para el clon 29494; 2,3 nM para el clon 29520 y 32 nM para el clon 29527; 2,7 nM para el clon 32919 y 3,2 nM para el clon 32931, lo que demuestra una fuerte actividad funcional consecutiva al bloqueo de la señalización inhibidora de TIGIT. Los clones 29489 y 31282 (el mutante 29489 con una mutación de M a T en el residuo 116) se compararon también, y los valores de CE_{50} fueron respectivamente 4,3 nM y 8,1 nM para el ejemplo mostrado en la figura 12C, lo que demuestra una actividad funcional similar para los 2 clones.
- 25 **B. Ensayo funcional basado en linfocitos T CD8⁺ primarios humanos**

- 30 Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT humano, se cocultivaron linfocitos T CD8⁺ primarios humanos de PBMC de donadores humanos sanos con la línea celular CHO-K1 manipulada para que exprese CD155 humano y para activar los linfocitos T humanos. Se observó que la liberación de IFNg por linfocitos T CD8⁺ en presencia de células CHO-K1 que expresan CD155 manipuladas podía aumentarse bloqueando hTIGIT con anticuerpos antagonistas anti-TIGIT. Para comparar la potencia de estos anticuerpos para aumentar la liberación de IFNg, el experimento se realizó en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo y se calcularon los valores de CE_{50} .

- 35 Se sembraron células Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) en placas de 96 pocillos con fondo en U de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 37 °C, incubadora de CO2 al 5 % O/N. Al día siguiente, se purificaron los linfocitos T CD8⁺ de acuerdo con las recomendaciones del fabricante usando el kit de selección negativa (Stemcell Technologies, 17953) a partir de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica humanos congelados aislados de sangre total de donadores sanos (Immunehealth). Entonces se

incubaron los linfocitos T CD8 purificados con concentraciones crecientes (0,11 nM, 0,33 nM, 1,06 nM, 3,3 nM, 10,6 nM, 33,3 nM, 105,5 nM y 333 nM) de anticuerpos (100 000 linfocitos T CD8/100 μ l de medio completo que contenía anticuerpo) durante 1 hora. Después de esto, se añadió la mezcla de anticuerpo-CD8 a las placas de células CD155 aAPC/CHO-K1 que contenían 50 μ l de medio completo reciente y se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 5 días. Por último, se evaluaron las concentraciones de IFNg en el sobrenadante celular usando un ensayo ELISA (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86) que se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Como se muestra en la figura 13A, todos los anticuerpos anti-TIGIT aumentaron la secreción de IFNg sobre el control de isótipo. El aumento más alto se observó con el clon 29489 (6,4 veces) seguido de 29494 (5,8 veces), 29520 (5,4 veces), 29499 (5,2 veces), 29527 (4,5 veces) y 29513 (3,2 veces).

También se realizó estudio de intervalo de dosis (entre 0,22 nM y 333 nM de anticuerpo anti-TIGIT) para evaluar el valor de CE_{50} para el aumento en la secreción de IFNg por linfocitos T CD8 primarios humanos. Como se muestra en la figura 13B, el anticuerpo anti-TIGIT 29489 mostró la mejor actividad con una CE_{50} de 3,5 nM seguido del clon 29527 (CE_{50} = 5,1 nM), el clon 29494 (CE_{50} = 6,1 nM) y el clon 29520 (CE_{50} = 11,1 nM). Por último, se ensayaron el clon 29489 y su mutante 31282 en paralelo y demostraron una actividad similar con un valor de CE_{50} respectivo de 0,49 nM y 0,50 nM (figura 13C). Conjuntamente, estos datos demuestran una fuerte actividad funcional de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT para bloquear la señal inhibidora de TIGIT en linfocitos T humanos CD8+ y para aumentar las funciones efectoras, como se caracteriza por un fuerte aumento en la producción de IFNg.

20 C. Ensayo funcional de TIL humanos

Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT humano en linfocitos de infiltración tumoral (TIL) de pacientes con cáncer, se cocultivaron linfocitos T CD8+ primarios humanos de TIL de paciente con ascitis ovárica con la línea celular CHO-K1 manipulada para que exprese CD155 humano y para activar los linfocitos T humanos. Se observó que la liberación de IFNg por linfocitos T CD8+ en presencia de células CHO-K1 que expresan CD155 manipuladas puede aumentarse bloqueando hTIGIT con anticuerpos antagonistas anti-TIGIT.

30 Se sembraron células Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) en placas de 96 pocillos con fondo en U de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 37 °C, incubadora de CO2 al 5 % O/N. Al día siguiente, se purificaron los linfocitos T CD8 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante usando el kit de selección negativa (Stemcell Technologies, 17953) a partir de TIL humanos congelados aislados de ascitis ovárica (Immunehealth). Los linfocitos T CD8+ purificados entonces se incubaron con el clon 26452 de anticuerpo anti-TIGIT, el precursor no optimizado de los clones 29489 y 31282 (100 000 linfocitos T CD8+/100 μ l de medio completo que contiene anticuerpo) durante 1 hora. Después de esto, se añadió la mezcla de anticuerpo-CD8 a las placas de células CD155 aAPC/CHO-K1 que contenían 50 μ l de medio completo reciente y se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 5 días.

40 Por último, se evaluaron las concentraciones de IFNg en el sobrenadante celular usando un ensayo ELISA (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86) que se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Como se observa en la figura 14, la secreción de IFNg se aumentó en casi 2 veces cuando el anticuerpo anti-TIGIT se añadía al cocultivo. Estos datos demuestran una fuerte actividad funcional de los anticuerpos antagonistas anti-TIGIT para bloquear la señal inhibidora de TIGIT en TIL humanos CD8+ y para aumentar las funciones efectoras de los linfocitos T en un entorno tumoral.

45 Ejemplo 11: Caracterización de anticuerpo antagonista anti-TIGIT con actividad funcional en ratón

A. Ensayo de competición con CD155 de ratón para anticuerpo antagonista anti-TIGIT equivalente

50 Para este ensayo, se usaron células Jurkat (clon E6-1, ATCC TIB-152) manipulada para que sobreexpresen TIGIT de ratón (Jurkat-mTIGIT). Se usó el anticuerpo anti-TIGIT 26493 como equivalente ya que este anticuerpo mostraba reactividad cruzada por TIGIT de ratón, así como unión a TIGIT humano. Las células se preincubaron durante 45 min a 37 °C con diferentes concentraciones del clon 26493 de anticuerpo anti-TIGIT (de 0,03 a 10 μ g/ml) en 25 μ l de medio completo (RPMI + FBS al 10 %). Las células se lavaron una vez y se incubaron con 4 μ g/ml de proteína marcadora CD155 de ratón-His-Fc (Thermo Fisher, 50259M03H50) en 50 μ l de medio completo durante 45 min en incubadora. Las células se lavaron una vez, y se tiñeron con anticuerpo PE-anti-His (Biolegend, 362603) durante 30 min a 4 °C. Se usó la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) medida por FACS como medida de la unión de CD155 a Jurkat-mTIGIT. La figura 15A muestra la curva de respuesta a dosis del clon 26493 anti-TIGIT para la competición con CD155, que identifica 2,3 nM como CI_{50} (la línea de puntos superior representa la señal del isótipo, la línea de puntos inferior la señal de las células sin CD155). Estos resultados demuestran la eficacia funcional del anticuerpo anti-TIGIT para competir con el ligando CD155 por TIGIT de ratón.

B. Ensayo in vitro funcional de ratón: citotoxicidad específica de antígeno (OT-I)

65 Para evaluar la actividad citotóxica específica de antígeno de linfocitos T CD8+ OT-I hacia células diana estimuladas con OVA y el efecto de anticuerpo anti-TIGIT en este ensayo, se aislaron células OT1 de los bazos de ratones

C57BL/6-Tg^(TcrαTcrβ)1100Mjb/Crl (Charles River) por disociación mecánica seguida de selección negativa para linfocitos T de ratón usando el kit de aislamiento de linfocitos T de ratón EasySep™ (Stemcell, catálogo n.º 19851). Como células presentadoras de antígeno, las células cancerosas PanO2 que expresan de forma natural CD155, se trataron con mitomicina C (25 ng/ml) y posteriormente se estimularon con péptido de OVA (S7951-1MG, Sigma

5 Aldrich, 1 µg/ml, 1 h a 37 °C). Los linfocitos T CD8+ y las células PanO2 se cocultivaron durante 3 días en presencia del clon 26493 anti-TIGIT o el control de isotipo a 133 nM. En el día 3, se recogió el sobrenadante para la detección de IFNg por ELISA (figura 15B) y los linfocitos T para el ensayo de citotoxicidad (figura 15C). Como células diana, se usaron células PanO2 estimuladas con OVA. Las células diana y las células PanO2 no estimuladas (control interno sin diana), 1 x 10⁶ cada una, se marcaron con CFSE (C1157, ThermoFisher) y kit de proliferación celular CellTrace™

10 10 Far Red (C34564, ThermoFisher) respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas células se mezclaron (relación 1:1) y se sembraron en placa a 2 x 10⁴ células por pocillo. Los linfocitos T CD8+ OT-I estimulados se añadieron a 1 x 10⁵ células/pocillo (células efectoras) provocando una relación de efector a diana de 10:1 en presencia del clon 26493 anti-TIGIT o el control de isotipo a 133 nM. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS y se levantaron por tratamiento con tripsina. Las células entonces se tiñeron con kit de tinción de células muertas de violeta fijable para vivas/muertas (Molecular Probes, L34955). Entonces se midió la destrucción citotóxica de las células diana controlando el cambio en la relación de células diana vivas a células que no son diana por citometría de flujo.

15 15

20 La figura 15B muestra que el anticuerpo anti-TIGIT aumenta la producción de IFNg en casi 2 veces, mientras que la figura 15C muestra una actividad citotóxica aumentada de linfocitos T CD8+ OT-I de ratón de aproximadamente un 60 %. Conjuntamente, estos resultados confirman la actividad funcional del anticuerpo anti-TIGIT para aumentar la función efectora de linfocitos T CD8+ de ratón.

25 **Ejemplo 12: Actividad antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT en monoterapia y en combinación con anticuerpos anti-PD1 en modelo de ratón**

*A. Actividad antitumoral *in vivo* de anticuerpo antagonista anti-TIGIT en monoterapia*

30 Para este experimento, se produjo el clon 26493 anti-TIGIT en células de mamífero en un isotipo IgG2a de ratón. Se inocularon ratones Balb/c hembra de 8 semanas con 500 000 células de cáncer de colon CT26 (ATCC® CRL-2638™) por vía subcutánea. En el día 9 después de la inoculación, cuando los volúmenes de los tumores eran de promedio de aproximadamente 45 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento con un volumen de tumor igual (n = 8 por grupo). Los ratones se trataron con 200 µg de anticuerpo anti-TIGIT o con control de isotipo (mlgG2a, BioXcell) o con 200 µg de anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) y 200 µg de control de isotipo (mlgG2a, BioXcell) o con 200 µg de anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) y diferentes concentraciones de anticuerpo anti-TIGIT (200 µg, 60 µg, 20 µg) mediante inyecciones intraperitoneales en el día 9, el día 12 y el día 15. El crecimiento tumoral se controló y se midieron los volúmenes de los tumores con calibres electrónicos tres veces a la semana desde el día 9 hasta el día 36. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió de 2000 mm³. Las curvas de crecimiento tumoral se analizaron estadísticamente mediante un modelo mixto lineal.

35 40 Las diferencias entre los grupos de tratamiento se evaluaron ensayando la interacción del tiempo*grupo de tratamiento. Para ensayar un efecto sinérgico entre el anticuerpo anti-TIGIT y el anticuerpo anti-PD-1, los grupos de tratamiento se recodificaron mediante una combinación de dos variables; anticuerpo anti-TIGIT (sí/no) y anticuerpo anti-PD-1 (sí/no). Un efecto sinérgico, por encima del efecto aditivo de cada tratamiento (anti-TIGIT*tiempo y anti-PD-1*tiempo) se evaluó ensayando el término de interacción anti-TIGIT*anti-PD-1*tiempo.

45 50 La figura 16A muestra las curvas de la mediana de crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia. Mientras que en el grupo de control, ningún ratón obtuvo regresión del tumor, 2/8 ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT obtuvieron una respuesta completa. En los demás ratones, estuvo presente un claro retardo en el crecimiento tumoral. En el grupo de control, ningún ratón sobrevivió más allá de 30 días, mientras que en el grupo tratado, 7/8 ratones sobrevivieron más allá de 30 días.

55 60 La figura 16B muestra las curvas de la mediana de crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para ratones tratados con anticuerpo anti-PD1 en monoterapia o en combinación con anticuerpo anti-TIGIT. Hubo una supresión significativa del crecimiento tumoral en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT+anti-PD-1 en comparación con monoterapia anti-PD-1 (p<0,0001). La combinación de anticuerpo anti-TIGIT + anti-PD-1 consiguió una eficacia antitumoral sinérgica que fue mayor que el efecto aditivo de ambos tratamientos de monoterapia (p = 0,02). La combinación de anticuerpos anti-TIGIT (a 200 ug) y anti-PD1 provocó que 7/8 ratones mostraran una respuesta completa. La eficacia antitumoral se mantuvo con la combinación de anticuerpo anti-PD1 y dosis inferiores de anticuerpo anti-TIGIT que consigue respuesta completa para 8/8 ratones cuando el anticuerpo anti-TIGIT se disminuía hasta 60 µg y 5/8 ratones cuando el anticuerpo anti-TIGIT se disminuía adicionalmente hasta 20 µg (figura 16C). Estos datos demuestran la eficacia antitumoral significativa del tratamiento anti-TIGIT en monoterapia (p<0,0001) o en combinación con un anticuerpo anti-PD1 (p<0,0001) para el tratamiento de tumores preestablecidos.

Ejemplo 13: Actividad antitumoral dependiente de isotipo de anticuerpo antagonista anti-TIGIT en monoterapia y en combinación con anticuerpos anti-PD1 en modelo de ratón.

Para este experimento, se produjo el clon 26493 anti-TIGIT en células de mamífero en un isotipo IgG2a de ratón e isotipo IgG1 de ratón. Se inocularon ratones Balb/c hembra de 8 semanas con 500 000 células de cáncer de colon CT26 (ATCC® CRL-2638™) por vía subcutánea. En el día 10 después de la inoculación, cuando los volúmenes de los tumores eran de promedio de aproximadamente 100 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento con un volumen de tumor igual (n = 10 por grupo). Para la evaluación de la monoterapia, los ratones se trataron con 200 µg de anticuerpo anti-TIGIT o control de isotipo (mlgG2a, BioXcell) mediante inyecciones intraperitoneales en el día 10, el día 13 y el día 16. Para la evaluación de la combinación con anticuerpo anti-PD-1, los ratones se trataron con 200 µg de anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) y 200 µg de control de isotipo (mlgG2a, BioXcell) o mediante la combinación de 200 µg de anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) y 200 µg de anticuerpo anti-TIGIT mediante inyecciones intraperitoneales en el día 10, el día 13 y el día 16. El crecimiento tumoral se controló y se midieron los volúmenes de los tumores con calibres electrónicos tres veces a la semana desde el día 10 hasta el día 33. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió de 2000 mm³.

La figura 17A muestra las curvas de la mediana del crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para monoterapia con anticuerpo anti-TIGIT y la figura 17B para la politerapia con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD1. Tanto en monoterapia como en combinación con anticuerpo anti-PD-1, el tratamiento con anticuerpo anti-TIGIT provocó una eficacia antitumoral significativa cuando se administraba como un isotipo IgG2a de ratón (p = 0,0001 y p = 0,009 respectivamente). Sin embargo, no pudo observarse eficacia antitumoral con anticuerpo anti-TIGIT como un isotipo IgG1 de ratón, lo que sugiere que la interacción del receptor de Fc con mlgG2a es importante para la eficacia antitumoral de los anticuerpos antagonistas anti-TIGIT en el modelo CT26 murino. Estos datos demuestran la eficacia antitumoral dependiente de isotipo del tratamiento anti-TIGIT en monoterapia o en combinación para el tratamiento de tumores preestablecidos.

Ejemplo 14: Caracterización del mecanismo de acción de la actividad antitumoral *in vivo* de anticuerpo antagonista anti-TIGIT

30 *A. Análisis de citometría de flujo de bazo y tumor*

Para investigar el modo de acción *in vivo* del anticuerpo antagonista anti-TIGIT, se analizaron tumores por citometría de flujo para el infiltrado de inmunocitos después del tratamiento con anticuerpo anti-TIGIT 26493 (IgG2a), en monoterapia y en combinación con anticuerpo anti-PD-1. Los ratones se inocularon y se trataron como se describe en el ejemplo 12. Dos días después del segundo tratamiento, los ratones (8 ratones por grupo) se sacrificaron y se recogieron los tumores. Los tumores se disociaron con un kit de disociación de tumor (Miltenyi Biotec). Para tinción *ex-vivo* directa, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD45, anti-CD4, anti-CD8 y anti-FoxP3 (todos de eBioscience) después de tinción con un tinte de viabilidad (Molecular Probes, L34955) y Fc-block. Para estimulación *ex vivo*, las células se incubaron con cóctel de estimulación celular (eBioscience) e inhibidor del transporte de proteínas (eBioscience) durante 3 horas. Esto estuvo seguido de tinción con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y Fc-block. Después de la fijación y permeabilización con tampones comerciales (tampón de fijación IC y tampón de permeabilización), las células se tiñeron con anticuerpo anti-IL-10 y anti-IFNg (todos de eBioscience). En todas las figuras, se muestra el porcentaje de cambio en comparación con el grupo de control relevante (control de isotipo para monoterapia, anti-PD-1 para la combinación), representando un valor negativo una disminución y un valor positivo un aumento en comparación con el grupo de control.

La figura 18A muestra que el tratamiento *in vivo* del tumor con anticuerpo mlgG2a anti-TIGIT provoca una disminución en la proporción de linfocitos T reguladores dentro de la población de TIL CD4+ de un 28 % en comparación con el grupo de control, que no se observa después del tratamiento con mlgG1 anti-TIGIT. Esto muestra que hay una reducción de los linfocitos Treg TIGIT+, lo que posiblemente explica la eficacia diferencial de los dos isotipos como se analiza en el ejemplo 14. La figura 18B muestra que no hay reducción de los TIL CD8+, sino que en su lugar se observa un pequeño aumento para los dos isotipos (un aumento de un 17 % en comparación con el control para mlgG1 y un 16 % para mlgG2a). Estos hallazgos conjuntos producen un aumento de más de un 50 % de la relación de CD8/Treg en tumor tratado con mlgG2a anti-TIGIT (figura 18C). La funcionalidad de los linfocitos T intratumorales también se mejora para el grupo tratado con anticuerpo mlgG2a anti-TIGIT, con un fuerte aumento en la producción de IFNg de los TIL tanto CD4+ (figura 18D) como CD8+ (figura 18E). Esto provocó un fuerte aumento en la relación de células productoras de IFN-g/células productoras de IL-10 después de estimulación *ex vivo* en los TIL CD4+/población CD8+ (figura 18F).

60 La figura 18G muestra que combinar mlgG2a anti-TIGIT con anticuerpo anti-PD-1 provoca que los linfocitos T reguladores disminuyan en un 33 % en comparación con monoterapia anti-PD-1. De nuevo, para los linfocitos T CD8+ lo contrario es cierto, con un aumento de un 22 % y un 28 % en la infiltración de linfocitos T CD8+, respectivamente para los isotipos mlgG1 y mlgG2a, en comparación con monoterapia anti-PD-1 (figura 18H). Conjuntamente, esto provoca un aumento de más de dos veces en la relación de TIL CD8+ a Treg en el tumor para la combinación con mlgG2a anti-TIGIT (figura 18I). Adicionalmente, el tratamiento con anticuerpo mlgG2a anti-TIGIT combinado con anticuerpo anti-PD-1 demuestra un desplazamiento en el fenotipo Th1 frente a Th2 para los linfocitos

T CD4+ intratumorales, con un notable aumento en las células CD4 productoras de IFNg (figura 18J) y una disminución en las células CD4 productoras de IL-10 (figura 18K). Esto provocó un fuerte aumento en las células productoras de IFNg/IL-10 después de estimulación *ex vivo* en la población de TIL CD4+ en comparación con ratones tratados con anticuerpo anti-PD-1 en monoterapia (figura 18L).

5

Tabla 11: Genes expresados de forma diferencial entre ratones tratados con mlgG2a anti-TIGIT y vehículo

Símbolo del gen	Log2 del cambio factorial	Valor p corregido
Ccr2	-1,29	0,0000668
Prf1	1,79	0,0000668
Ctsg	2,13	0,0000668
Ctla4	1,72	0,00309
Gzmb	1,51	0,00309
Ccl2	0,56	0,0174
Il2ra	1,61	0,0174
Cd55	1,64	0,0213
Il2rb	0,872	0,0379
Cd274	0,982	0,0385
Klrg1	1,3	0,0402
Icos	1,26	0,0402
Il1rn	0,87	0,0402
Cx3cr1	-0,82	0,0428
C1ra	0,896	0,0428
Cd33	-0,906	0,0479
Ccl4	0,886	0,0518

Tabla 12: Genes expresados de forma diferencial entre ratones tratados con mlgG2a anti-TIGIT + anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-PD1

Símbolo del gen	Log2 del cambio factorial	Valor p corregido
Ctsg	2,34	0,0000375
Prf1	1,69	0,000255
Gzmb	1,71	0,000766
Cd55	2,08	0,00131
Entpd1	0,839	0,00131
Klrg1	1,76	0,00132
Itga1	0,874	0,0017
Ctla4	1,72	0,00173
Il2ra	1,82	0,00237
Itgb3	0,863	0,00237
Slc11a1	0,849	0,00329
Cd36	1,44	0,0049
Cd180	0,899	0,00602
Icam1	0,893	0,00802
Cd274	1,06	0,00993
Cd40	0,926	0,0113
Eomes	1,28	0,0113
Abcg1	0,869	0,0113
Ccr2	-0,781	0,0122
Thy1	0,868	0,0165
Ccl2	0,501	0,0203
Gbp5	1,12	0,0216
Icos	1,24	0,0263
Tgfbr2	0,458	0,0278
H2 K1	0,292	0,0307

(continuación)

Símbolo del gen	Log2 del cambio factorial	Valor p corregido
Sh2d1a	0,999	0,0307
Il2rb	0,808	0,0307
Selp1g	0,64	0,031
Bst1	0,702	0,0317
Cd247	1	0,032
Irf8	0,699	0,0365
Il21r	0,899	0,0392
Gbp2b	1,11	0,0392
Stat1	0,865	0,0427
C4b	0,922	0,0428
Abca1	0,537	0,044
Trem2	0,482	0,0454

B. Análisis transcriptómico del tumor por NanoString

5 Para investigar el modo de acción *in vivo* del anticuerpo anti-TIGIT, el infiltrado de inmunocitos de los tumores tratados con anticuerpo anti-TIGIT, en monoterapia y en combinación con anticuerpo anti-PD-1, se analizó por análisis transcriptómico (Nanostring). Los ratones se inocularon y se trajeron como se describe en el ejemplo 12. Dos días después del tercer tratamiento con anticuerpos anti-TIGIT y/o anti-PD1, los ratones se sacrificaron y se recogieron los tumores. Se extrajo el ARN y se cuantificó directamente la expresión de una selección de 770 genes implicados en la inmunología del cáncer con la tecnología nCounter (panel PanCancer Immune Profiling, Nanostring; realizado por VIB Nucleomics Core). Los datos se analizaron con el programa informático nSolver (Nanostring).

10 La figura 19A muestra un diagrama de volcán de los genes que estaban regulados de forma diferencial entre los ratones tratados con vehículo y los ratones tratados con mlgG2a anti-TIGIT. Los genes de muy estadísticamente significativos están en la parte superior del diagrama, y los genes muy diferencialmente expresados están a cada lado (izquierda: regulados por disminución en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT, derecha: regulados por aumento en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT). Ejemplos de genes muy regulados por aumento incluyen perforina, granzima B y CTLA-4. La línea continua representa un valor p no corregido de 0,01, la línea de puntos un valor p corregido de 0,05 (corrección de Benjamini-Hochberg). La tabla 11 y la tabla 12 muestran los genes que se expresaron significativamente de forma diferencial para mlgG2a anti-TIGIT en comparación con vehículo y anticuerpo aPD-1+mlgG2a anti-TIGIT frente a anticuerpo anti-PD1 respectivamente. Cuando se resumían múltiples genes en puntuaciones para subconjuntos funcionales de inmunocitos, el hallazgo más sorprendente fue un aumento en la puntuación de células citotóxicas y linfocitos T CD8+ (figura 19B). Estuvieron presentes los mismos cambios en ratones tratados con anticuerpo anti-PD-1 + mlgG2a anti-TIGIT en comparación con anticuerpo anti-PD-1 en solitario. No se observaron cambios en ratones tratados con mlgG1 anti-TIGIT, en monoterapia o en combinación con anticuerpo anti-PD-1.

15 Conjuntamente, estos resultados demuestran que la eficacia antitumoral observada después de tratamiento *in vivo* con anticuerpo anti-TIGIT está mediada por un infiltrado de Treg disminuido en el tumor, mientras que la población de linfocitos T efectores CD8+ está aumentada. Además, la función efectora de los TIL CD4+ y CD8+ está aumentada como se muestra por la mayor proporción de células productoras de IFNg, el desplazamiento hacia una respuesta Th1 y la expresión aumentada de genes importantes para las funciones citotóxicas de los linfocitos T.

Ejemplo 15: Actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) inducida por anticuerpos antagonistas anti-TIGIT

A. ADCC *in vitro* en PBMC humanos de donadores sanos

20 PBMC aislados de donadores humanos sanos se resuspendieron en medio RPMI completo (complementado con FBS inactivado por calor al 10 % + 50 U de penicilina + 50 U de estreptomicina, y complementado con 200 UI de IL-2/ml). Se distribuyeron $2,5 \times 10^5$ de PBMC humanos por pocillo en placa de 96 pocillos en U. El clon 26452 de anticuerpo anti-TIGIT humano producido en células de mamífero o control de isótipo IgG1 (Biolegend, 403102) se añadió a una concentración final de 66,6; 0,66 y 0,006 nM a cada pocillo correspondiente. Las células se incubaron durante 20 h a 37 °C con CO2 al 5 %. Después las células se recogieron y se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), ant-TCRab-PercP-Cy5.5 (clon IP26, Biolegend 306723), anti-CD4-BV510 (clon SK3, BD Horizon 562970), anti-CD8-APC-Cy7 (clon SK1, Biolegend 344714), anti-CD25-BV605 (clon 2A3, Biolegend 562660), anti-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), anti-CCR7- BV421 (clon G043H7, Biolegend 353207) y anti-CD45RO-PE-Cy7 (clon UCHL1, Biolegend 304229). Los resultados se presentan en células vivas seleccionadas. CD45+CD4+ o CD45+CD8+ representa los linfocitos T totales CD4+ o CD8+. Las

células CD45+RO+CD4+ o CD45+RO+CD8+ representan los linfocitos T de memoria CD4+ o CD8+ mientras que CD25^{alto}CD127^{bajo}CD4+ representa los linfocitos Treg. La proporción de células TIGIT+ en Treg seleccionados es mayor que en linfocitos T CD8+ de memoria y linfocitos T CD4+ seleccionados, como se muestra en la figura 20A.

- 5 La cuantificación absoluta se hace usando microesferas de recuento AccuCheck (Life technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante. Después del cálculo de los números absolutos de células por μ l, se calcula el % de lisis específica usando la siguiente fórmula = $(1 - (\text{número absoluto de células por } \mu\text{l en muestra tratada con anticuerpo 26452 contra TIGIT} / \text{promedio de un triplicado de tratamiento sin anticuerpo})) \times 100$. Como se muestra en la figura 20B, el anticuerpo hlgG1 anti-TIGIT 26452 activa mayor lisis específica en Treg (62,22 %) que en linfocitos T CD8+ totales (12,2 %) o linfocitos T CD4+ totales (16,36 %).
- 10

B. ADCC ex vivo en tumor de ratón

- 15 Para confirmar que el anticuerpo IgG2a de ratón anti-TIGIT puede reducir los linfocitos T reguladores TIGIT+, se configuró un ensayo de ADCC *ex vivo*. Se inocularon ratones Balb/c hembra de 8 semanas con 500 000 células de cáncer de colon CT26 (ATCC® CRL-2638™) por vía subcutánea. Tres semanas después de la inoculación, se recogieron los tumores y se disociaron con un kit de disociación de tumor (Miltenyi Biotec). La suspensión de células individuales se incubó con anticuerpo anti-TIGIT 26493 133 nM (isotipo mlgG1 o mlgG2a) durante 20 h (1 millón de células/200 μ l en RPMI + FBS al 10 %). Después de 20 h, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD4, anti-TIGIT, 20 anti-CD8 y anti-FoxP3 (todos de eBioscience) después de tinción con un tinte de viabilidad (Molecular Probes, L34955) y Fc-block.

- 25 La figura 21 muestra el % de disminución en los recuentos absolutos de células TIGIT+ en comparación con tratamiento con control de isotipo para los diferentes subconjuntos de inmunocitos TIGIT+. La disminución más fuerte después de tratamiento con anticuerpo mlgG2a anti-TIGIT es evidente en linfocitos T reguladores (aproximadamente un 40 % de disminución), lo que sugiere que estas células son más susceptibles a ADCC que los linfocitos T CD4+ o CD8+ convencionales.

- 30 En general, estos resultados demuestran la eficacia de hlgG1 o mlgG2a anti-TIGIT de reducir los inmunocitos TIGIT+ con una actividad más fuerte demostrada sobre la población Treg.

Ejemplo 16: Predicción de la inmunogenia usando análisis *in silico*

- 35 Se evaluó el potencial inmunógeno de los clones 29494 y 29489, así como su variante 31282 por predicción *in silico* usando puntuación de proteínas EpiMatrix (De Groot *et al.* (2009) Clinical Immunol. 131:189). Para completar el análisis, se analizaron las secuencias introducidas en tramos de 9 unidades solapantes y cada tramo se evaluó con respecto a un panel de ocho alelos comunes de HLA de clase II. Estos alelos son "supertipos". Cada uno es funcionalmente equivalente a, o casi equivalente a, muchos alelos adicionales del "miembro de la familia". Tomados colectivamente, estos ocho alelos de supertipo, junto con sus respectivos miembros de la familia, "cubren" bastante más del 95 % de la población humana (Southwood *et al.* (1998) J. Immunol. 160:3363). Cada "evaluación" de tramo-alelo es una manifestación sobre la afinidad de unión a HLA prevista. Las puntuaciones de evaluación EpiMatrix varían de aproximadamente -3 a +3 y están distribuidas normalmente. Puntuaciones de evaluación EpiMatrix por encima de 1,64 se definen como "aciertos"; es decir, potencialmente inmunógenos y dignos de consideración adicional.

- 45 45 Siendo todos los demás factores iguales, cuantos más ligandos HLA (es decir, aciertos EpiMatrix) estén contenidos en una proteína dada, mayor probabilidad habrá de que la proteína induzca una respuesta inmunitaria. La puntuación de proteínas EpiMatrix es la diferencia entre el número de epítopos de linfocitos T previstos que se espera encontrar en una proteína de un tamaño dado y el número de supuestos epítopos previstos por el sistema EpiMatrix. La puntuación de proteínas EpiMatrix está correlacionada con la inmunogenia observada. Las puntuaciones de proteínas EpiMatrix se "normalizan" y pueden representarse en una escala normalizada. La puntuación de proteínas EpiMatrix de una proteína "promedio" es cero. Puntuaciones de proteínas EpiMatrix por encima de cero indican la presencia de exceso de ligandos MHC e indican un mayor potencial de inmunogenia, mientras que puntuaciones por debajo de cero indican la presencia de menos ligandos MHC potenciales que los esperados y un menor potencial de inmunogenia. Proteínas que se puntúan por encima de +20 se considera que tienen un potencial inmunógeno significativo.

Ajuste a la presencia de epítopos de linfocitos T.

- 60 60 Los anticuerpos son proteínas únicas en que las secuencias de aminoácidos de sus dominios variables, especialmente sus regiones determinantes de complementariedad (CDR), pueden variar hasta un grado extraordinario. Es esta variabilidad la que permite que los anticuerpos reconozcan una amplia diversidad de antígenos. Sin embargo, los acontecimientos de recombinación y mutación que controlan la maduración de los anticuerpos también pueden producir nuevo epítopos o neoepítopos de linfocitos T. Estos neoepítopos pueden parecer "exógenos" para linfocitos T en circulación. La presencia de neoepítopos en secuencias de anticuerpo puede dar lugar a la formación de una respuesta de anticuerpo humano-antihumano; también conocida como respuesta
- 65

HAHA o ADA (anticuerpos antifármaco).

Los linfocitos T reguladores desempeñan una función importante en suprimir las respuestas inmunitarias a proteínas completamente humanas en la periferia, incluyendo las que contienen secuencias mutadas y/o muy variables tales como las CDR de anticuerpo. Los linfocitos T reguladores se acoplan y activan por epítopos de linfocitos T reguladores. El riesgo inherente asociado con la presencia de neoepítopos en secuencias de anticuerpo parece estar equilibrado por la presencia de epítopos de linfocitos T reguladores de origen natural.

Cribando las secuencias de muchos aislados de anticuerpos humanos, EpiVax ha identificado varios ligandos HLA muy conservados que se cree que tienen un potencial regulador. La evidencia experimental sugiere que muchos de estos péptidos son, de hecho, activamente tolerógenos en la mayoría de sujetos. Estos epítopos de linfocitos T muy conservados, reguladores y promiscuos se conocen ahora como Tregítopos (De Groot *et al.* (2008) Blood 112:3303)

En muchos casos, el potencial inmunógeno de los neoepítopos contenidos en anticuerpos humanizados puede controlarse de manera eficaz en presencia de números significativos de Tregítopos. Con el propósito de análisis de inmunogenicidad de los anticuerpos, EpiVax ha desarrollado una puntuación EpiMatrix ajustada a Tregítopo y la predicción correspondiente de respuesta antianticuerpo terapéutico. Para calcular la puntuación EpiMatrix ajustada a Tregítopo, las puntuaciones de los Tregítopos se deducen de la puntuación de proteínas EpiMatrix. Las puntuaciones ajustadas a Tregítopo han mostrado estar muy correlacionadas con la respuesta inmunitaria clínica observada para un conjunto de 23 anticuerpos comerciales (De Groot *et al.* (2009) Clinical Immunol. 131:189).

Las secuencias de anticuerpo de los clones 29489, 29494 y 31282 puntuán en el extremo inferior de la escala EpiMatrix, lo que indica potencial limitado de inmunogenicidad. El análisis de regresión de anticuerpos monoclonales autorizados predice una respuesta ADA en -0 % de los pacientes expuestos para el clon de anticuerpo 29489 y 31282. Para el clon 29494, el análisis predice respuesta ADA en un 2,78 % de los pacientes expuestos para la secuencia VH basal, y un 2,88 % para la secuencia VH variante. Los datos se resumen en la tabla 13, a continuación.

Tabla 13: Puntuaciones EpiMatrix y EpiMatrix ajustadas a Tregítopo

Secuencia introducida	Longitud	Evaluaciones	EpiMatrix	Puntuación EpiMatrix	Puntuación EpiMatrix ajustada a Tregítopo
29489_VH	121	904	40	-19,41	-47,26
29489_VL	108	800	39	-17,58	-51,75
31282_VH	121	904	40	-19,41	-47,26
31282_VL	108	800	39	-17,58	-51,75
29494_VH	125	936	54	2,68	-7,18
29494_VL	107	792	40	-12,2	-38,83

Ejemplo 17: Determinación de la afinidad para la unión de clones anti-TIGIT a proteína TIGIT humana recombinante

El anticuerpo 31282 se comparó frente a clones de anticuerpo anti-TIGIT descritos en otras solicitudes de patente. Específicamente, 31282 se comparó con: 4.1 D3.Q1E (también denominado 4.1D3, del documento WO2017/053748); 22G2 (del documento WO2016106302); 31C6 (del documento WO2016/028656); 313M2 (del documento WO2016/191643); y TIG1 (del documento WO2017/152088). Las referencias y secuencias de los clones de anticuerpo comparados se muestran en la tabla 14 a continuación:

Tabla 14: Secuencias de dominios VH y VL de anticuerpos anti-TIGIT comparativos

Clon a-TIGIT	Referencia	Secuencia
4.1D3.Q1E	VH: SEQ ID NO: 34 del documento WO2017/053748 VL: SEQ ID NO: 36 del documento WO2017/053748	Secuencia VH: EVQLQSGPGLVKPQTLSSLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSP SRGIEWLGKTYYRFKWNSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSIQL NSVTPEDAVFYCTRESTTYDLLAGPFDYWGQQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 343 en el presente documento) Secuencia VL: DVMQTQSPDSDLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQ KPGQPPNLLIYWAStRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAED VAVYYCQQYYSTPFTGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 344 en el presente documento)
22G2	VH: SEQ ID NO:7 del documento WO2016/106302 VL: SEQ ID NO:9 del documento WO2016/106302	Secuencia VH: QVHLQESGPGLVKPSETLSSLCTVSGGSVSSGGIYWWSMRQPP GKGLEWIGYYSGSTNNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDYYVSGNYYNVDDYFFGVDDWGQQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 345 en el presente documento) Secuencia VL: EVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQVSYYLAWYQQKPQGQA PRLLYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPPPLFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 346 en el presente documento)

(continuación)		
Clon a-TIGIT	Referencia	Secuencia
31C6 (MEB125.31C6.A1.205 VH4/VL1)	VH: SEQ ID NO:127 del documento WO2016/028656 VL: SEQ ID NO:130 del documento WO2016/028656	Secuencia VH: EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAKASGYTFSSYVMHWVRQAPG QGLEWIGYIDPYNDGAKYAAQKFQGRVTLTSDDKSTSTVYMELOSSL RSEDTAVYYCARGGPYGVYFDVWGGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 347 en el presente documento) Secuencia VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEHIYSYLSWYQQKPGKAP KLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ HFGSPLTFQQGTRLEIK (SEQ ID NO: 348 en el presente documento)
313M32	VH: SEQ ID NO:67 del documento WO2016/191643 VL: SEQ ID NO:68 del documento WO2016/191643	Secuencia VH: QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDSYAWNWIROPPG KGLEWIGYISYSGSTSYNPSLRSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTA ADTAVYYCARRQRQVGLGFAYWGGTLTVSS (SEQ ID NO: 349 en el presente documento) Secuencia VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAIVYQQKPGKA PKLLIYASYYRTGVPSRFSGSGSGTDFFTFTISSLQPEDFATYYC QQHYSTPWTFG (SEQ ID NO: 350 en el presente documento)

(continuación)		
Clon a-TIGIT	Referencia	Secuencia
TIG1	VH: SEQ ID NO: 10 del documento WO2017/152088 VL: SEQ ID NO:14 del documento WO2017/152088	<p>Secuencia VH: DVQVESGGGLVQPGGSRKLSCAAAGFTFSNFGMHWWRQAPE KGLEWAFISGSSIIYYADTVKGRTISRDNPKNTLFLQMTSLR SEDTAMYYCARMRLDYYAMDYWGQQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 351 en el presente documento)</p> <p>Secuencia VL: DVQITQSPSYLAASPGETITINCRAKSISISKYLAVVYQEKGKTNK LLYSGSTLQSGIIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYCCQQ HNEYPWTGGGTLEIK (SEQ ID NO: 352 en el presente documento)</p>

A. Producción en células de mamífero

Para producir cantidades suficientes de clones a-TIGIT seleccionados para caracterización adicional, se generaron vectores de ADN que codifican clones de anticuerpo específicos (clones 31282_up, 4.1D3, 22G2, 31C6, 313M32 y

5 TIG1) y se transdujeron en células HEK para la producción de isótipo IgG1 humano. Los fragmentos de ADN sintéticos optimizados para los codones humanos para dominios variables de anticuerpo se solicitaron a Geneart. Las secuencias del dominio variable se ligaron sin problemas en vectores de expresión pUPe que contenían la secuencia señal de IgKappa de ratón y regiones constantes de la clase de anticuerpo respectiva. Los vectores de expresión se verificaron por análisis de restricción y secuenciación de ADN. Para la transfección transitoria, se produjeron maxipreps de ADN sin endotoxinas (Sigma) y los vectores de la cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK293EBNA1, en medio Freestyle (ThermoFisherScientific), de acuerdo con protocolos establecidos. Se añadió Primatone (0,55 % de volumen final) 24 horas después de la transfección. El medio acondicionado se recogió 6 días después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron por lotes mediante 10 cromatografía de afinidad Mabselect sureLX (GE Healthcare). Los anticuerpos unidos se lavaron en 2 etapas con PBS que contenía NaCl 1 M y PBS. Los anticuerpos se eluyeron con citrato 20 mM, NaCl 150 mM pH 3 y se neutralizaron hasta aproximadamente pH 7 con 1/6 del volumen de K2HPO4/KH2PO4 1 M pH 8.

15

A continuación, los anticuerpos se purificaron adicionalmente por filtración en gel usando una columna Superdex200, equilibrada en PBS. Las fracciones se analizaron por NuPAGE y las fracciones que contenían anticuerpo se combinaron. Los productos finales se esterilizaron sobre un filtro de jeringa de 0,22 µM. El producto se analizó por 20 NuPAGE y se midieron los niveles de endotoxina por ensayo LAL.

Adicionalmente, también se produjo el clón 31282 en células CHO-K1 de la siguiente manera (clón 31282_wu) en 25 isótipo IgG1 o IgG4. Se construyeron vectores de ADN que codifican los anticuerpos y se transfirieron en células CHO-K1. Se sintetizaron fragmentos de ADN de codones optimizados para CHO para los dominios variables de anticuerpo, y se ligaron en vectores de expresión que contenían la secuencia señal y las regiones constantes de la clase de anticuerpo respectiva. Los vectores de expresión se verificaron por análisis de restricción y secuenciación de ADN. Los vectores de cadena pesada y ligera se cotransfirieron en células CHO-K1 por electroporación (Bio- 30 rad) de acuerdo con protocolos establecidos. Los cultivos transfectados se aumentaron de escala y se inocularon en cultivos discontinuos. Se recogió el medio acondicionado después de 14 días de cultivos discontinuos.

El cultivo celular recogido en primer lugar se aclaró mediante dos fases de filtración en profundidad con D0HC y 35 A1HC (Millipore) conectados en serie. Después, la recolección aclarada en primer lugar se purificó por cromatografía de afinidad con MabSelect SuRe (GE Healthcare). Los anticuerpos unidos se lavaron en 2 etapas con NaAc-HAc 50 mM (pH 5,5) que contenía NaCl 1 M y NaAc-HAc 50 mM (pH 5,5). Los anticuerpos entonces se eluyeron con NaAc-HAc 50 mM (pH 3,5) y se neutralizaron hasta aproximadamente pH 5,5 con Tris-HCl 1 M (pH 9,0).

A continuación, el intermedio neutralizado se pulió adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico (AEX) 40 usando POROS HQ50 (Life Tech) en modo de flujo directo. La columna se equilibró mediante NaAc-HAc 50 mM (pH 5,5) antes de la carga. El flujo directo de AEX recogido durante la etapa de carga y recuperación se pulió adicionalmente por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) en modo de unión-elución usando POROS XS (Life Tech.). La columna de CEX se equilibró en NaAc-HAc 50 mM (pH 5,5), y los anticuerpos se eluyeron mediante 45 elución en gradiente lineal (LGE) hasta alcanzar NaAc-HAc 50 mM (pH 5,5) que contenía NaCl 0,5 M en 10 CV. La ultrafiltración y diafiltración (UF/DF) final usando Pellicon 3, ultracel 30 kD, tipo A (Millipore) se realizó para concentrar el eluido de CEX e intercambiar el tampón a His-HCl 20 mM (pH 5,5). Posteriormente, se añadió polisorbato 80 (PS80) y sacarosa en la muestra diafiltrada para obtener el producto final del que la concentración fue aproximadamente 20 g/l, en el tampón de His-HCl 20 mM, PS 80 al 0,01 % (p/p) y sacarosa al 9 % (p/v) (pH 5,5). El producto ha pasado todos los ensayos PQA. La pureza SEC, el nivel de endotoxinas y otros criterios todos han cumplido los requisitos.

B. Medición Biacore

Se realizó análisis con biodetector a 25 °C en un sistema de tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, 55 EDTA 3 mM, Tween20 al 0,05 %) usando tecnología Biacore T200, chip detector CM5 (procesado en Novalix, Francia). El alojamiento de la muestra se mantuvo a 8 °C. Se inmovilizó anticuerpo de cabra de captura anti-IgG humana (específico del fragmento Fcγ, Jackson ImmunoResearch Laboratories) (10000 UR) en ambas cubetas de lectura del chip detector usando química de acoplamiento amina convencional. Este tipo de superficie proporcionó un formato para capturar de forma reproducible anticuerpo de análisis reciente después de cada etapa de regeneración. La cubeta de lectura 2 se usó para analizar el anticuerpo capturado mientras que la cubeta de lectura 60 1 se usó como cubeta de lectura de referencia. Se prepararon 6 concentraciones de antígeno diferentes que variaban de 30 a 0,123 nM en tampón de migración. Cada una de las concentraciones de muestra de antígeno se procesó como una sola réplica, excepto 3,33 nM procesada por duplicado. También se procesaron dos inyecciones de blanco (tampón) y se usaron para evaluar y sustraer los artefactos del sistema. Las fases de asociación (300 s) y disociación (600 s) para todas las concentraciones de antígeno se realizaron a un caudal de 30 µl/min. La superficie 65 se regeneró con tres inyecciones secuenciales (15 s, 15 s y 60 s) de glicina-HCl 10 mM, pH 1,5. Los sensogramas obtenidos se ajustaron globalmente a un modelo 1:1 (suponiendo los mismos valores cinéticos para todas las

concentraciones aplicadas). La afinidad también se determinó a partir de estado en equilibrio para el clon 313M32 ya que el ajuste al modelo cinético 1:1 no era fiable, lo que muestra un equilibrio con TIGIT humano al final del tiempo de asociación. Los resultados obtenidos para los diferentes clones a-TIGIT se presentan en la tabla 15.

5

Tabla 15: Evaluación de cinética y afinidad

Clon	Modelo cinético de unión 1:1				Modelo en estado de equilibrio	
	K _a (1/s)	K _d (1/s)	K _d (nM)	Rmáx (UR)	K _d (nM)	Rmáx (UR)
31282_wu	3,86 ⁺⁰⁶	4,62 ⁻⁰⁴	0,120	16,7		
31282_up	3,70 ⁺⁰⁶	4,75 ⁻⁰⁴	0,128	15,3		
4.1D3	1,07 ⁺⁰⁶	4,72-05	0,044	14,4		
22G2	2,51 ⁺⁰⁶	1,78 ⁻⁰⁴	0,071	11,1		
31C6	3,10 ⁺⁰⁶	2,09 ⁻⁰⁴	0,067	16,7		
313M32	na	na	na	na	10,1	17,2
TIG1	5,24 ⁺⁰⁶	1,31 ⁻⁰²	2,49	11,1		

Ejemplo 18: Unión celular de anticuerpos antagonistas anti-TIGIT**A. Unión de clones of anti-TIGIT a Jurkat-hTIGIT**

10 Se ha medido la afinidad de anticuerpos humanos anti-TIGIT usando células Jurkat E6.1 transducidas con TIGIT humano (Jurkat hTIGIT). Para analizar la afinidad de los anticuerpos seleccionados por hTIGIT, se distribuyeron 10⁵ células por pocillo y se incubaron con concentración decreciente (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,016; 8 x 10⁻³ y 4 x 10⁻³ nM) de diversos clones de anticuerpo antagonista anti-TIGIT (figura 2). Los anticuerpos se

15 incubaron con las células durante 20 min a 4 °C en tampón FACS. Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-Ig humano (específico de Fc gamma)-PE (eBioscience, 12-4998-82, a 2,5 µg/ml) durante 20 min en hielo y se lavaron dos veces. La intensidad de fluorescencia se analizó usando LSR BD Fortessa y la unión celular se registró como la mediana de la intensidad de fluorescencia de PE en células que expresan TIGIT en su superficie.

20 La mitad de la concentración máxima de unión (CE₅₀) a Jurkat-hTIGIT se calculó usando una ecuación de ajuste a curva de cuatro variables en Prism. Los resultados se ilustran en la figura 22A y los valores se resumen en la tabla 16 a continuación. Los valores de CE₅₀ para la unión a Jurkat-hTIGIT son muy cercanos para el clon 31282 sin diferencias notables entre el anticuerpo producido en células HEK (31282_up, 0,13 nM) o en células CHO-K1 (31282_wu, 0,10 nM). El clon 31C6 y TIG1 también muestran valores de CE₅₀ por debajo de 0,2 nM, mientras que la afinidad por otros clones (4.1D3, 22G2 y 313M32) es menor y los resultados muestran valores de CE₅₀ que varían de 0,267 a 0,445 nM. Los resultados demuestran una fuerte unión a TIGIT humano expresado en membrana en un sistema manipulado para los clones anti-TIGIT 31282, 31C6 y TIG1, mientras que otros clones tienen una afinidad menor.

Tabla 16: Datos de CE₅₀ y comparación de diferentes clones a-TIGIT para la unión a Jurkat-hTIGIT

Clon	CE ₅₀ de unión a Jurkat-hTIGIT (en nM)	Cambio factorial de CE ₅₀ sobre la CE ₅₀ del mejor clon (31282_wu)
31282_wu	0,10	1
31282_up	0,13	1,3
313M32	0,44	4,2
4.1D3	0,27	2,5
22G2	0,32	3,0
31C6	0,13	1,2
TIG1	0,17	1,6

B. Unión de clones anti-TIGIT a linfocitos T CD8⁺ primarios de PBMC humanos sanos

35 Se analizaron PBMC humanos aislados de voluntarios sanos para la unión por anticuerpos antagonistas anti-TIGIT. Las células se distribuyeron a 1 x 10⁵ células por pocillo. Las células se incubaron con anticuerpo anti-CD16 (clon

- 3G8, BioLegend 302002), CD32 (clon FLI8.26, BD Bioscience 557333) y CD64 (BD Bioscience 555525) a temperatura ambiente durante 10 min, y los clones de anticuerpo anti-TIGIT humano indicados se añadieron directamente a una concentración final de 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,016; 8×10^{-3} y 4×10^{-3} nM en tampón FACS y se incubaron durante 20 min a 4 °C. Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-Ig humano (específico de Fc gamma)-PE (eBioscience, 12-4998-82, a 2,5 µg/ml) durante 20 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos y mezcla de LVD: anti-CD4-PercP-Cy5.5 (clon A161A1, BioLegend 357414); anti-CD8-BV510 (clon SK1, BD Bioscience 563919) y LVD efluor 660 (eBioscience 65-0864-18).
- 5 Los valores de CE_{50} para la unión a linfocitos T primarios humanos CD8+ se calcularon usando la señal MFI sobre linfocitos T CD8+ TIGIT+ vivos. Los resultados se ilustran en la figura 22B y las concentraciones CE_{50} se resumen en la tabla 17 a continuación. Los valores de CE_{50} para la unión a linfocitos T CD8+ primarios son muy cercanos para el clon 31282 sin diferencias notables entre el anticuerpo producido en células HEK (31282_up, 0,21 nM) o en células CHO-K1 (31282-wu, 0,19 nM). La comparación entre los diferentes clones de anticuerpos antagonistas a-TIGIT muestra el mejor valor de CE_{50} para la unión sobre linfocitos T CD8+ primarios humanos para el clon 31282_wu (0,19 nM) y el clon 31282_up (0,21 nM). Los clones 31C6 y TIG1 muestran una diferencia en la CE_{50} de 2 veces, mientras que el clon 22G2, 313M32 y 4.1D3 difiere en un factor de 6,1 a 9,7 veces. En general, 31282_wu and 31282_up muestran la mejor unión a TIGIT expresado en membrana en linfocitos T CD8+ primarios humanos.
- 10 15
- 15
- 20

Tabla 17: Datos de CE_{50} y comparación de diferentes clones a-TIGIT para la unión a linfocitos T CD8⁺ humanos

Clon	Concentración CE_{50} para la unión a linfocitos T CD8 ⁺ (en nM)	Cambio factorial de CE_{50} sobre la CE_{50} del mejor clon (31282_wu)
31282_wu	0,19	1
31282_up	0,21	1,1
313M32	1,45	7,5
4.1D3	1,88	9,7
22G2	1,17	6,1
31C6	0,39	2,0
TIG1	0,38	2,0

C. Unión de clones anti-TIGIT a linfocitos T CD8⁺ primarios de PBMC de pacientes con cáncer

- 25 Se analizaron PBMC humanos aislados de pacientes con cáncer para la unión por diferentes clones de anticuerpo antagonista anti-TIGIT. Las células se distribuyeron a 1×10^5 células por pocillo. Las células se incubaron con anticuerpo anti-CD16 (clon 3G8, BioLegend 302002), CD32 (clon FLI8.26, BD Bioscience 557333) y CD64 (BD Bioscience 555525) a temperatura ambiente durante 10 min, y los anticuerpos anti-TIGIT humano indicados se añadieron directamente a una concentración final de: 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 y 0,031 nM en tampón FACS y se incubaron durante 20 min a 4 °C. Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-Ig humano (específico de Fc gamma)-PE (eBioscience, 12-4998-82, a 2,5 µg/ml) durante 20 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos y mezcla de tinte de viabilidad vital (LVD): anti-CD4-PercP-Cy5.5 (clon A161A1, BioLegend 357414); anti-CD8-BV510 (clon SK1, BD Bioscience 563919) y LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). Las células se lavaron y se fijaron y se cuantificó la tinción superficial usando BD LSR Fortessa. Los datos de citometría de flujo se analizaron usando FlowJo V10.1. Se usó MFI de TIGIT en células LVD TIGIT⁺CD8⁺ seleccionadas para calcular los valores de CE_{50} . Se muestran curvas de regresión no lineal en la figura 22C y los valores resumidos en la tabla 18 a continuación.
- 30 35
- 40
- 45

Los clones 31282_wu y 31282_up muestran un valor de CE_{50} muy cercano para la unión en linfocitos T CD8+ de pacientes con cáncer con concentración de 0,14 y 0,12 nM, respectivamente. El resto de los clones muestran menor afinidad, mostrando el clon 31C6, TIG1 y 22G2 una afinidad 1,5, 2,7 y 3,1 veces menor, respectivamente. El valor de CE_{50} medido para el clon 313M32 es 8,3 veces menor en comparación con el clon 31282_up. El clon 4.1D3 muestra la afinidad más baja, que se une con una diferencia de 9,5 veces para el mejor clon ensayado.

Tabla 18: Datos de CE_{50} y comparación de diferentes clones a-TIGIT para la unión a linfocitos T CD8⁺ humanos de pacientes con cáncer

Clon	Valor de CE_{50} para la unión a linfocitos T CD8 ⁺ (en nM)	Cambio factorial de CE_{50} sobre la CE_{50} del mejor clon (31282)
31282_wu	0,14	1,2
31282_up	0,12	1,0
313M32	1,0	8,3
4.1D3	1,15	9,5
22G2	0,37	3,1
31C6	0,18	1,5
TIG1	0,33	2,7

Ejemplo 19: Ensayo de competición entre clones de anticuerpo antagonista anti-TIGIT y ligando natural de TIGIT (CD155)

Se recogieron células Jurkat que sobreexpresaban TIGIT humano (Jurkat-hTIGIT) y se distribuyeron a $5,10^4$ células/pocillo y se incubaron con anticuerpos anti-TIGIT humano a las siguientes concentraciones: 133,33; 42,20; 13,33; 4,22; 1,33; 0,422; 0,133; 0,042; 0,0133; $4,2 \times 10^{-3}$; $1,3 \times 10^{-3}$; $4,2 \times 10^{-4}$; $1,3 \times 10^{-4}$; $4,2 \times 10^{-5}$ nM en medio completo durante 45 min a 37 °C. Se lavó el exceso de anticuerpo, y después las células se incubaron con CD155-His a 15 µg/ml (Creative Biomart, PVR-3141H) durante 45 min a 37 °C. Entonces, se detectó CD155-His unido usando anti-marca de His-PE (Biologend, 362603, a 2 µl por ensayo), incubado durante 30 min a 4 °C. Las células se analizaron por FACS usando BD LSRLFortessa y la mitad de la concentración (Cl_{50}) que evita la unión de CD155 se calculó basándose en la mediana de la intensidad de fluorescencia de PE en células totales.

Los resultados se ilustran en la figura 23 y los valores se resumen en la tabla 19 a continuación. Los clones anti-TIGIT 31282_wu y 31282_up muestran los mejores valores de Cl_{50} para la competición con CD155 en células Jurkat manipuladas para que expresen hTIGIT con concentración de 0,05 y 0,04 nM respectivamente. Otros clones (4.1D3, 22G2, 31C6, TIG1) tienen valores de Cl_{50} entre 0,07 y 0,09 nM, mientras que el clon 313M32 compite con CD155 por la unión a TIGIT con una eficacia mucho menor (0,65 nM).

Tabla 19: Datos de Cl_{50} y comparación de diferentes clones a-TIGIT para la competición con CD155 en TIGIT humano

Clon	Cl_{50} de competición de CD155 por la unión a TIGIT (en nM)	Cambio factorial de Cl_{50} sobre la Cl_{50} del mejor clon (31282_up)
31282_wu	0,05	1,3
31282_up	0,04	1
313M32	0,65	16,7
4.1D3	0,07	1,9
22G2	0,09	2,2
31C6	0,07	1,7
TIG1	0,06	1,6

Ejemplo 20: Caracterización funcional de clones antagonistas anti-TIGIT**A. Ensayo funcional de TIGIT con células Jurkat-hTIGIT**

Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT humano, se cocultivaron células Jurkat, que expresan hTIGIT y un indicador de luciferasa activado tras acoplamiento de TCR (células Thaw-and-Use TIGIT Effector de Promega), con la línea celular CHO-K1 manipulada para que exprese PVR/CD155 humano y activador de TCR (Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 de Promega). La activación de células Jurkat que sobreexpresan TIGIT puede inducirse por contacto con células CHO-K1 que expresan CD155 tras acoplamiento de TCR en células Jurkat y puede aumentarse en presencia de anticuerpo antagonista anti-TIGIT. Para comparar la potencia de los diferentes clones a-TIGIT para aumentar la activación de células Jurkat, el experimento se realizó en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo y se calcularon los valores de CE_{50} .

Se sembraron células CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 37 °C, incubadora de CO2 al 5 % O/N. Al día siguiente, se añadieron células TIGIT Effector (Promega, CS198811) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante a las placas de células CD155

5 aAPC/CHO-K1 que contenían medio completo reciente con anticuerpo anti-TIGIT a concentraciones crecientes (0,03; 0,11; 0,33; 1,06; 3,34; 10,56; 33,38; 105,49; y 333 nM) y se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 6 horas. Después de las 6 horas de incubación, se evaluó la activación de las células TIGIT Effector midiendo la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa Bio-GloTM (Promega, G7941).

10 Como se muestra en la figura 24A y se resume en la tabla 20, el anticuerpo anti-TIGIT 31282 tiene la mejor eficacia en términos de valor de CE₅₀ e inducción máxima de la señal de luciferasa en el ensayo. La actividad observada para el clon producido en células HEK (31282_up) o CHO-K1 (31282_wu) es comparable con una señal de luciferasa máxima que es 8 veces mayor que el isótipo de control (Bioexcell, BE0297) y con una concentración CE₅₀ medida a 3,3 nM y 3,5 nM respectivamente. A modo de comparación, los clones 4.1D3, 22G2 y 31C6 tienen una 15 actividad máxima entre 5,3 y 6,7 veces sobre el control de isótipo, asociada con una CE₅₀ entre 5 y 10 nM. Los valores de CE₅₀ para el clon 313M32 y TIG1 no pudieron determinarse debido a una baja actividad y mal ajuste de las curvas a las concentraciones ensayadas (figura 24A).

20 **Tabla 20: Datos de CE₅₀ y comparación de diferentes clones a-TIGIT para la actividad funcional en células Jurkat-hTIGIT**

Nombre del clon	Inducción sobre el control de isótipo (cambio factorial)	CE ₅₀ (nM)	Cambio factorial de CE ₅₀ sobre la CE ₅₀ del mejor clon (31282_up)
31282_wu	8,4	3,5	1,1
31282_up	8,0	3,3	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	5,8	10,3	3,1
22G2	5,3	5,2	1,6
31C6	6,7	5,3	1,6
TIG1	/	P.F.	/
P.F.: mal ajuste (poor fit)			

B. Ensayo funcional de TIGIT en linfocitos T CD8⁺ primarios humanos de voluntarios sanos

25 Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT humano, se cocultivaron linfocitos T CD8⁺ primarios humanos de PBMC de donadores humanos sanos con la línea celular CHO-K1 manipulada para que exprese PVR/CD155 humano y para activar los linfocitos T humanos. Se observó que la liberación de IFNg por linfocitos T CD8⁺ en presencia de células CHO-K1 que expresan CD155 manipuladas podía aumentarse bloqueando hTIGIT con anticuerpos antagonistas anti-TIGIT. Para comparar la potencia de estos anticuerpos para aumentar la liberación de IFNg, el experimento se realizó en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo y se 30 calcularon los valores de CE₅₀.

35 Se sembraron células CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) en placas de 96 pocillos con fondo en U de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 37 °C, incubadora de CO2 al 5 % O/N. Al día siguiente, se purificaron los linfocitos T CD8⁺ de acuerdo con las recomendaciones del fabricante usando el kit de selección negativa (Stemcell Technologies, 17953) a partir de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica humanos congelados aislados de sangre total de donadores sanos (Immunehealth). Linfocitos T CD8 purificados y 40 concentraciones crecientes (0,011 nM, 0,033 nM, 0,11 nM, 0,33 nM, 1,06 nM, 3,3 nM, 10,6 nM, 33,3 nM y 105,5 nM) de anticuerpos entonces se añadieron a CD155 aAPC/CHO-K1 (100 000 linfocitos T CD8/100 ul de medio completo que contenía anticuerpo) y se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 5 días. Por último, se evaluaron las concentraciones de IFNg en el sobrenadante celular usando un ensayo ELISA (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86) que se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

45 Como se muestra en la figura 24A y se resume en la tabla 21, el clon a-TIGIT 31282 y 4.1D3 presenta la mejor inducción de secreción de IFNg con un aumento respectivo de 2,7 y 2,9 veces sobre el anticuerpo de control de isótipo. El clon 31282 tiene la mejor eficacia para la inducción de producción de IFNg en términos de concentración de CE₅₀, que se midió a 0,13 nM. El clon 31C6 muestra un valor de CE₅₀ 2,3 veces diferente, mientras que el clon 22G2 y 4.1D3 son 3,1 y 10,8 menos potentes que el clon 31282. No pudo determinarse ningún valor para el clon 313M32 debido a una baja actividad y mal ajuste de las curvas a las concentraciones ensayadas (figura 24B).

Tabla 21: Datos de CE_{50} y comparación de diferentes clones a-TIGIT para la actividad funcional en linfocitos T CD8⁺ primarios humanos

Clon	Inducción sobre el control de isotipo (cambio factorial)	CE_{50} (nM)	Cambio factorial de CE_{50} sobre la CE_{50} del mejor clon (31282_wu)
31282_wu	2,7	0,13	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	2,9	1,43	10,8
22G2	1,5	0,41	3,1
31C6	1,6	0,30	2,3

C. Ensayo funcional de TIGIT en linfocitos T CD3⁺ primarios humanos de pacientes con cáncer

5 Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT humano en linfocitos T de pacientes con cáncer, se cocultivaron linfocitos T CD3+ primarios humanos de PBMC de un paciente con cáncer con una línea celular CHO-K1 manipulada para que exprese PVR/CD155 humano y para activar los linfocitos T humanos (CHO-TCR-CD155). Se observó que la liberación de IFNg por linfocitos T CD3+ en presencia de células CHO-K1 que expresan CD155 manipuladas podía aumentarse bloqueando hTIGIT con el anticuerpo antagonista anti-TIGIT 31282.

10 Se sembraron células CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) en placas de 96 pocillos con fondo en U de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 37 °C, incubadora de CO2 al 5 % O/N. El día 15 siguiente, se purificaron los linfocitos T CD3+ de acuerdo con las recomendaciones del fabricante usando el kit de selección negativa (Stemcell Technologies, 17951) a partir de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica humanos recientes aislados de sangre total de un paciente con cáncer (HNSCC) recogida 24 h antes (Biopartners). Los linfocitos T CD3+ purificados y 66,7 nM de anticuerpos se añadieron entonces a CD155 aAPC/CHO-K1 (100 000 linfocitos T CD3/100 ul de medio completo que contiene anticuerpo) y se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 5 días. Por último, se evaluaron las concentraciones de IFNg en el sobrenadante celular usando un ensayo ELISA (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86) que se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

20

25 Como se muestra en la figura 24C, el anticuerpo 31282 indujo una fuerte actividad funcional para aumentar la secreción de IFNg, lo que demuestra el potencial de este anticuerpo a-TIGIT de reactivar los linfocitos T de PBMC de pacientes con cáncer.

D. El clon a-TIGIT 31282 aumenta la producción de citocinas intracelulares en linfocitos T de PBMC de paciente con cáncer y células tumorales disociadas (DTC)

30 En este ejemplo, se realizó tinción por citometría de flujo intracelular para evaluar la producción de citocinas de linfocitos T a partir de PBMC coincidentes recién aislados y linfocitos infiltrados en tumor dentro de las células tumorales disociadas (DTC) de pacientes cancerosos con carcinoma de riñón. Para DTC, los tumores se picaron mecánicamente, después se incubaron con kit de disociación de tumor (Miltenyi Biotech n.º 130-095-929) en rotación en un disociador gentleMACS, siguiendo las instrucciones del fabricante para tipos de tumor específicos.

35 Las células se estimularon durante 16 h con un cóctel de microesferas de estimulación de linfocitos T (Dynabeads, Thermo Fisher) antes de realizar la tinción intracelular. Durante las últimas 3 horas de estimulación, se añadieron a las células cóctel inhibidor del transporte de proteínas (eBioscience) y cóctel de estimulación celular (eBioscience). Los anticuerpos conjugados se adquirieron de eBioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend o BD Biosciences. La tinción superficial se realizó según las instrucciones del fabricante usando tampón FACS filtrado (PBS + EDTA 2 mM + BSA al 0,1 %) y tampón de tinción brillante (BD n.º 563794). Las células se bloquearon con Human FcBlock apropiado (BD n.º 564220) antes de la tinción superficial. Para la tinción intracelular, las células se fijaron y se permeabilizaron usando solución BD Cytofix/cytoperm (BD Biosciences). Las células se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: anti-CD45-BB515 (clon HI30, BD Horizon 564585), anti-CD73-BV421 (clon AD2, BD Horizon 562430), anti-CD8a-BV510 (clon SK1, BD Horizon 563919), anti-CD3-BV650 (clon SK7, BD Horizon 563999), anti-IFNy-BV711 (clon 4S.B3, BD Horizon 564793), anti-IL-2-APC (MQ1-17H12, eBioscience 17-7029-82), anti-CD4-APC-R700 (clon RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), anti-TIGIT-PE (clon MBSA43, eBioscience E13456-108), anti-CD39-PE-Dazzle594 (clon A1, Biolegend 328224) y TNF α -PE-cy7 (clon Mab11, eBioscience 25-7349-82). La adquisición se realizó en un FACS Fortessa (BD Biosciences) y se analizó con el programa informático FlowJo (FlowJo, LLC). Las células viables se seleccionaron en dispersión directa y lateral.

40

45

50 Se seleccionaron subconjuntos de linfocitos T de la siguiente manera: CD45+ CD3+ para PBMC y CD45+ CD3+CD4+ y CD45+ CD3+ CD8+ para DTC. Los linfocitos T secretores de citocinas se seleccionaron usando controles sin teñir y sin estimular.

La figura 24D muestra que el contenido intracelular de IL2, IFNg y TNFa estaban todos aumentados tras la activación en presencia del clon a-TIGIT 31282. Este aumento se observó en linfocitos T CD3+ de PBMC de acuerdo con los datos ilustrados en la figura 24C, pero también en TIL tanto CD4+ como CD8+ de células tumorales disociadas. Esto demuestra el potencial del clon a-TIGIT 31282 de aumentar la activación de poblaciones de PBMC y TIL a partir de linfocitos T de pacientes con cáncer.

Ejemplo 21: El clon a-TIGIT 31282 induce citotoxicidad preferente de Treg en PBMC de pacientes con cáncer

En este ejemplo, se resuspendieron PBMC aislados de un paciente con cáncer pulmonar en medio RPMI completo (complementado con FBS inactivado por calor al 10 % + 50 U de penicilina + 50 U de estreptomicina). Se distribuyeron $2,5 \times 10^5$ de PBMC humanos por pocillo en placa de 96 pocillos en U. El clon de anticuerpo anti-TIGIT humano 31282, el control de isótipo IgG1 humano (BioXcell BE0297) o Rituximab (InvivoGen hcd20-mab1) se añadieron a una concentración final de 6,6 nM a cada pocillo correspondiente. Las células se incubaron durante 20 h a 37 °C con CO2 al 5 %. Después las células se recogieron y se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), ant-TCRab-PercP-Cy5.5 (clon IP26, Biolegend 306723), anti-CD4-BV510 (clon SK3, BD Horizon 562970), anti-CD8-APC-Cy7 (clon SK1, Biolegend 344714), anti-CD25-BV605 (clon 2A3, Biolegend 562660), anti-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), anti-CCR7-BV421 (clon G043H7, Biolegend 353207) y anti-CD45RO-PE-Cy7 (clon UCHL1, Biolegend 304229). Los resultados se presentan en células vivas seleccionadas. La cuantificación absoluta se hace usando microesferas de recuento AccuCheck (Life technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante. Después del cálculo de los números absolutos de células por μ l, se calcula el % de lisis específica usando la siguiente fórmula = $(1 - (\text{número absoluto de células por } \mu\text{l en muestra tratada con anticuerpo 31282 contra TIGIT} / \text{promedio de un triplicado de muestras tratadas con isótipo de control})) \times 100$. Los resultados se presentan como la media del % de lisis específica en triplicados +/- DT. La actividad citotóxica de células efectoras de ADCC/ADCP se evaluó midiendo el % de lisis celular específica en células CD19+ seleccionadas tras incubación con Rituximab.

Como se muestra en la figura 25, el clon anti-TIGIT 31282 activa mayor lisis específica en linfocitos Treg (30,1 +/- 3 %) que en linfocitos T CD45RO+CCR7^{+/}CD8⁺ (linfocitos T CD8+ de memoria totales) (-1,48 +/- 6 %) o T CD45RO⁺CCR7^{+/}CD4⁺ (linfocitos T CD4+ de memoria totales) (0,64 +/- 3 %). El control positivo de Rituximab activa un 77,9 % (+/- 6,8 %) de lisis específica en células CD19+ seleccionadas. Los datos globales demuestran una reducción preferente de linfocitos Treg de PBMC de paciente con cáncer en comparación con las poblaciones totales de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria. Se observó reducción preferente similar de linfocitos Treg usando células de un paciente con adenocarcinoma de colon.

Ejemplo 22: Caracterización de expresión de TIGIT en poblaciones inmunitarias de PBMC de paciente con cáncer y células tumorales disociadas

Se realizaron análisis por citometría de flujo para evaluar la expresión de TIGIT en subconjuntos de inmunocitos de PBMC coincidentes recién aislados y linfocitos infiltrados en tumor dentro de células tumorales disociadas (DTC) de pacientes con cáncer. Se adquirieron muestras de diferentes indicaciones: cáncer de ovario, cáncer de riñón, HNSSC, carcinoma cutáneo, melanoma y cáncer pulmonar. Para DTC, los tumores se picaron mecánicamente, después se incubaron con kit de disociación de tumor (Miltenyi Biotech n.º 130-095-929) en rotación en un disociador gentleMACS, siguiendo las instrucciones del fabricante para tipos de tumor específicos. Se aislaron PBMC de sangre completa en un medio de gradiente de densidad (Lymphoprep Axis-Shield n.º 1115758). Los datos de fenotipado se compararon con PBMC congelados aislados de individuos sanos (n = 10).

Las células se tiñeron según las instrucciones del fabricante usando tampón FACS filtrado (PBS + EDTA 2 mM + BSA al 0,1 %) y tampón de tinción brillante (BD n.º 563794). Las células se bloquearon con FcBlock humano apropiado (BD n.º 564220) antes de la tinción y se fijaron usando tampón de fijación IC (eBioscience n.º 00-8222-49) antes de la adquisición. Las DTC se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: anti-CD45-BB515 (clon HI30, BD Horizon 564585), anti-CD73-BV421 (clon AD2, BD Horizon 562430), anti-CD8a-BV510 (clon SK1, BD Horizon 563919), anti-CD3-BV650 (clon SK7, BD Horizon 563999), anti-CD56-BV711 (clon 5.1H11, Biolegend 362542), anti-CD279-BV785 (clon EH12.2H7, Biolegend 329930), anti-CD127-APC (clon A019D5, Biolegend 351316), anti-CD4-APC-R700 (clon RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), anti-TIGIT-PE (clon MBSA43, eBioscience E13456-108), anti-CD39-PE-Dazzle594 (clon A1, Biolegend 328224) y CD25-PE-cy7 (clon BC96, Biolegend 302612). Los PBMC se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: anti-CD45RO-BB515 (clon UCHL1, BD Horizon 564529), anti-CD73-BV421 (clon AD2, BD Horizon 562430), anti-CD8a-BV510 (clon SK1, BD Horizon 563919), anti-CD3-BV650 (clon SK7, BD Horizon 563999), anti-CD56-BV711 (clon 5.1H11, Biolegend 362542), anti-CD197-BV786 (clon 3D12, BD Horizon 563710), anti-CD127-APC (clon A019D5, Biolegend 351316), anti-CD4-APC-R700 (clon RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), anti-TIGIT-PE (clon MBSA43, eBioscience E13456-108), anti-CD39-PE-Dazzle594 (clon A1, Biolegend 328224) y CD25-PE-cy7 (clon BC96, Biolegend 302612). La adquisición se realizó en un FACS Fortessa (BD Biosciences) y se analizó con el programa informático FlowJo (FlowJo, LLC). Las células viables se seleccionaron en dispersión directa y lateral. Se seleccionaron diversos subconjuntos de inmunocitos de la siguiente manera: CD3+ CD4+ CD127+ CD25⁺ (linfocitos no Treg CD3+ CD4+), CD3+ CD4+ CD127^{bajo} CD25⁺ (linfocitos T reguladores), CD3+ CD8+ (linfocitos T CD3+ CD8+), CD3⁻ CD56+ (linfocitos NK), CD3+ CD56+ (linfocitos NKT), CD3⁻ CD56⁻ (linfocitos no T/NK). Se procesaron

microesferas Quantibrite PE (BD n.º 340495) a los mismos ajustes del instrumento y se usaron para convertir los datos de fluorescencia en número de anticuerpos unidos por célula.

5 La frecuencia de expresión de TIGIT en diferentes poblaciones inmunitarias se representa en la figura 26A y la densidad de TIGIT para cada subconjunto se representa en la figura 26B usando representación de causando el método de Tukey para calcular los percentiles.

10 Los datos muestran que la frecuencia de TIGIT en el subconjunto de linfocitos T es mayor en PBMC de pacientes con cáncer en comparación con PBMC de donadores sanos. Esta frecuencia está más aumentada en DTC TIL (figura 26A). Aunque se hace la misma observación mirando la densidad de TIGIT en la superficie de linfocitos no Treg CD3+ CD4+ y linfocitos Treg CD4+, para los linfocitos T CD3+ CD8+ el número de moléculas TIGIT por célula está disminuido en DTC TIL (figura 26B).

Ejemplo 23: Cartografiado de epítopos estructurales y funcionales de TIGIT y clon 31282

15 Para caracterizar adicionalmente y comprender la interacción entre el clon 31282 del mAb anti-TIGIT y la proteína recombinante TIGIT, se determinó la estructura cristalina de 31282 en complejo con TIGIT por difracción de rayos X.

A. Expresión, purificación y cristalización de TIGIT y Fab

20 Se produjeron los residuos 23-128 de TIGIT humano por Proteros Biostructures GmbH. TIGIT (23-128) con la marca de HIS N terminal (escindible por trombina) se clonó en pET15b y se expresó en medio LB en BI21 (DE3) a 37 °C en cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión (IB) se lavaron con tampón que contenía Tris/HCl pH 7,4 y Tris/HCl pH 7,4, Brij-35 al 0,05 %. Los IB se desnaturizaron con Gdm/HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8,5 y DTT 10 mM. El replegamiento se realizó en Tris/HCl 50 mM pH 8, GSH 1 mM, GSSG 0,5 mM, NaCl 150 mM. La proteína replegada se purificó en HIS-trap. La marca de HIS N terminal se eliminó mediante escisión con trombina y purificación adicional en Superdex-75 equilibrada en Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM.

30 Para la expresión del fragmento Fab, se hicieron crecer células HEK293F en Freestyle F17 con penicilina/estreptomicina al 1 %, L-glutamina 2 mM y Pluronic al 0,1 %. Los cultivos expandidos para transfección se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 3 l (Corning, volumen de trabajo de cultivo celular de 2 l, 37 °C, CO₂ al 8 % v/v, 80 - 120 rpm, 50 mm de amplitud). El cultivo se diluyó un día antes de la transfección y el número de células se ajustó a 1 x 10⁶ células/ml. El volumen del cultivo de expresión fue 6 l. Se realizó una transfección transitoria con plásmidos para la cadena ligera y la pesada de Fab. Se preparó una mezcla fundamental de ADN/FectoPro (FectoPro, PolyPlus) en medio F17 puro y se incubó durante 10 minutos (de acuerdo con el protocolo PolyPlus). Esta mezcla de transfección se añadió a la suspensión celular gota a gota y el refuerzo se añadió inmediatamente. A las 18 h tras la transfección, el cultivo se alimentó con 3 g/l de glucosa.

40 Para la purificación del fragmento Fab, se recogieron 6 l de sobrenadante de cultivo celular HEK293 por centrifugación 6 días después de la transfección y se aplicaron a una columna KappaSelect de 30 ml. KappaSelect se lavó con PBS pH 7,4, se eluyó con clorato de sodio pH 3 y las fracciones que contenían Fab se neutralizaron con tampón Tris. El Fab se purificó adicionalmente en columna Superdex S-200 equilibrada en Tris 20 mM pH 8, NaCl 100 mM y se almacenó a -80 °C hasta uso adicional.

45 Para la formación del complejo de Fab-TIGIT, el TIGIT purificado se mezcló con Fab purificado en una relación de 1,5:1 y el complejo se purificó en Superdex-200 equilibrada en Tris 20 mM pH 8, NaCl 100 mM. El complejo de Fab-TIGIT se concentró hasta 35 mg/ml para la cristalización. El complejo de Fab-TIGIT se cristalizó a 277 K usando el método de difusión en vapor mezclando 0,1 µl de solución de proteína (35,3 mg/ml en TRIS 20 mM pH 8,0; NaCl 100 mM) en una relación de 1:1 con solución de reserva (cacodilato de sodio 0,10 M pH 6,00; PEG4000 al 15 % (p/v)). Los cristales se crioprotegieron sumergiéndolos en solución de reserva con glicerol al 25 % añadido.

B. Recogida de datos y procesamiento

55 Se estableció un protocolo de criogenia usando protocolos convencionales de Proteros Biostructures GmbH. Los cristales se han congelado ultrarrápidamente y se han medido a una temperatura de 100 K. Los datos de difracción de rayos X se recogieron de cristales del complejo de Fab:TIGIT en el SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Suiza) usando condiciones criogénicas. Los cristales pertenecen al grupo espacial P1. Los datos se procesaron usando los programas XDS y XSCALE. La recogida de datos y valores estadísticos de procesamiento pueden encontrarse en la tabla 22.

Tabla 22: Recogida de datos y valores estadísticos de procesamiento

Fuente de rayos X	PXII/X10SA (SLS ¹)
Longitud de onda [Å]	1,0000
Detector	PILATUS 6M
Temperatura [K]	100
Grupo espacial	P1
Celda: a; b; c; [Å] α; β; γ; [°]	41,73; 71,46; 110,26 96,7; 95,8; 106,5
Resolución [Å]	2,31 (2,56-2,31)
Reflejos únicos	50537 (13271)
Multiplicidad	2,0 (1,9)
Integridad [%]	96,1 (95,3)
R _{sim} [%]	8,1 (43,5)
R _{med} [%]	11,0 (59,1)
Media(I)/dt ³	8,11 (1,94)

¹ SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Suiza) ²los valores en paréntesis se refieren a la máxima resolución reunida ³calculada a partir de reflejos independientes

C. Modelado y refinamiento de la estructura

5 La información de fase necesaria para determinar y analizar la estructura se obtuvo por remplazo molecular. Se usó una estructura previamente resuelta de Fab como modelo de investigación. La posterior construcción del modelo y el refinamiento se realizaron de acuerdo con protocolos convencionales con los paquetes de programa informático CCP4 y COOT. Para el cálculo del factor R libre, una medida para validación de forma cruzada la corrección del modelo final, se excluyó aproximadamente un 2,5 % de los reflejos medidos del procedimiento de refinamiento (véase la tabla 23).

10 Se ha realizado el refinamiento de TLS (usando REFMAC5, CCP4), que produjo factores R inferiores y mayor calidad del mapa de densidades de electrones. Se han aplicado las restricciones locales de NCS generadas automáticamente (palabra clave "ncsr local" de las versiones de REFMAC5 más recientes). La parametrización del ligando y la generación de los archivos de recopilación correspondientes se realizaron con CHEMSKETCH y LIBCHECK (CCP4), respectivamente.

15 Se construyó el modelo de agua con el algoritmo "Find waters" de COOT, poniendo moléculas de agua en los picos del mapa de Fo-Fc contorneado a 3,0, seguido de refinamiento con REFMAC5 y comprobando todas las moléculas de agua con la herramienta de validación de COOT. Los criterios para la lista de moléculas de agua sospechosas fueron: factor B mayor de 80 Å², mapa de 2Fo-Fc menor de 1,2 σ, distancia hasta el contacto más cercano menor de 2,3 Å o mayor de 3,5 Å. Las moléculas de agua sospechosas y las que están en el sitio de unión a ligando (distancia hasta el ligando menor de 10 Å) se comprobaron manualmente. La estructura del complejo final se refinó con PHENIX. Se eligió el parámetro de refinamiento que incluye coordenadas XYZ, espacio real, factores B individuales y factores B de grupo. También se eligió optimizar la influencia de rayos X/estereoquímica y las restricciones de NCS para el refinamiento. El diagrama de Ramachandran del modelo final muestra un 95,39 % de todos los residuos en la región preferida, un 3,95 % en la región permitida. Los valores estadísticos de la estructura final y el proceso de refinamiento se enumeran en la tabla 23.

Tabla 23: Valores estadísticos de refinamiento¹

Resolución [Å]	108,40-2,31
Número de reflejos (trabajo/ensayo)	49289 / 1247
R _{Trabajo}	0,2025
R _{libre} [%]	0,2466

(continuación)

Número total de átomos:	
Proteína	8282
Agua	676
Desviación de la geometría ideal: ³	
Longitudes de enlace [Å]	0,003
Ángulos de enlace [grado]	0,771
Diagrama de Ramachandran: ²	
Regiones preferidas [%]	95,39
Regiones permitidas [%]	3,95
Regiones rechazadas [%]	0,66

¹ valores como se define en PHENIX
²Calculado con COOT

D. Estructura global

- 5 Las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab de anticuerpo humano muestran el plegamiento típico de anticuerpos humanos (figura 27A). Hay dos heterotímeros en la unidad asimétrica con básicamente la misma conformación global. El modelo comprende los residuos 23 a 128 de TIGIT, los residuos 1 a 224 de la cadena pesada del clon 31282 y los residuos 1 a 214 de la cadena ligera del clon 31282. Una corta región de bucle de la cadena pesada no está definida completamente por la densidad de electrones y, por tanto, no se ha incluido en el
- 10 modelo.

Las imágenes de difracción se analizaron usando el programa FoldX para estimar la contribución de energía de los residuos y definir los puntos calientes de interacción. Los residuos aminoacídicos que forman la superficie de contacto de unión están bien definidos en el mapa de densidad de electrones. Los datos de difracción de rayos X interpretados muestran claramente las interacciones entre el Fab y TIGIT (figura 27B y 27C). Las CDR de la cadena ligera del clon 31282 están interactuando con 2 regiones de TIGIT contactando Arg30 y Tyr33 de CDR L1 con los residuos de TIGIT Asn58 y Glu60; contactando Arg30 de CDR L1 y Phe93 de CDR L3 con el residuo de TIGIT Ile109. La CDR L2 no hace contacto con TIGIT (tabla 24). La cadena pesada del clon 31282 interactúa con diferentes regiones de TIGIT contactando Tyr33 de CDR H1 con TIGIT en el residuo Leu73; contactando Val50, Ser54 y Ser57 de CDR H2 con TIGIT en el residuo Leu73; contactando Asp102, Tyr103 y Trp104 de CDR H3 con TIGIT en el residuo Gln56, Ile68, Leu73 y His76.

En base a esta estructura cristalina del complejo del clon a-TIGIT 31282/TIGIT, se determinaron los residuos de TIGIT que contactan con el clon 31282 (residuos de epítopo para TIGIT unido por el clon 31282) y los residuos del clon 31282 que contactan con TIGIT (residuos de parátopo para el clon 31282 unido por TIGIT). Las tablas 24 y 25 y la figura 27C muestran los residuos de TIGIT en contacto con los residuos de la cadena ligera (tabla 24) o pesada (tabla 25) del clon 31282. Los residuos de contacto se definieron como cada aminoácido que cumple cada uno de los siguientes criterios: (i) tiene una contribución de energía libre de unión calculada mayor de 0,3 kcal/mol, (ii) tiene un factor B promediado experimental menor que el factor B medio de todos los residuos en la estructura de rayos X, (iii) genera al menos 3 pares de contactos interatómicos de átomos pesados con átomos del anticuerpo a una distancia menor de o igual a 4,0 Angstroms, (iv) no genera solamente enlaces de hidrógeno expuestos al disolvente o interacciones iónicas, (v) si es un residuo polar no aromático (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys o Arg), genera al menos un enlace de hidrógeno o interacción iónica con el anticuerpo.

35 **Tabla 24: Resumen de residuos de epítopo de TIGIT y residuos de parátopo correspondientes en la cadena ligera del clon 31282**

Aminoácido de TIGIT	Aminoácido de la cadena ligera del clon 31282
Asn 58	Tyr 33
Glu 60	Arg 30 Tyr 33
Ile 109	Arg30 Phe 93

Tabla 25: Resumen de residuos de epítopo de TIGIT y residuos de parátopo correspondientes en la cadena pesada del clon 31282

Aminoácido de TIGIT	Aminoácido de la cadena pesada del clon 31282
Gln 56	Trp 104
Ile 68	Tyr 103 Trp104
Leu 73	Tyr33 Val50 Ser 54 Val 50
His 76	Asp 102 Tyr 103 Trp104

Ejemplo 24: Ensayo de competición entre los clones 31282 y 32959 a-TIGIT.

5 El clon 32959 de anticuerpo anti-TIGIT de isotipo IgG1 humana se produjo en células HEK y se purificó como se describe en el ejemplo 17 anteriormente.

10 Se recogieron células Jurkat que sobreexpresaban TIGIT humano (Jurkat-hTIGIT) y se distribuyeron a $5,10^4$ células/pocillo y se incubaron con el clon 31282 antagonista a-TIGIT a las siguientes concentraciones: 0 nM (sin Ab), 0,08 nM, 0,16 nM, 0,8 nM y 8 nM que representan un intervalo de concentración de 0 a 100 veces la Kd de este clon. Se lavó el exceso de anticuerpo, y las células se incubaron con concentración decreciente (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,016; 0,008 y 0,004 nM) de clon 32959 anti-TIGIT directamente acoplado (AF647) durante 30 min a 4 °C. Se analizó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia usando LSR BD Fortessa. La unión celular se registró como la mediana de la intensidad de fluorescencia de AF647. Para el cálculo de la CE_{50} de unión del clon 32959, la mitad de la concentración máxima de unión (CE_{50}) a hTIGIT-Jurkat se calculó usando una ecuación de ajuste a curva de cuatro variables en Prism, y los valores obtenidos fueron se muestran en la tabla 26 y se ilustran en la figura 28. Los resultados muestran una fuerte unión del clon a-TIGIT 32959, independientemente de la concentración de clon 31282, lo que demuestra la ausencia de competición con un anticuerpo antagonista a-TIGIT.

15

20

Tabla 26: Concentración CE_{50} para la unión del clon a-TIGIT 32959 a Jurkat-hTIGIT en presencia de concentración creciente de clon antagonista a-TIGIT 31282

	a-TIGIT 31282 a 0 nM	a-TIGIT 31282 a 0,08 nM	a-TIGIT 31282 a 0,16 nM	a-TIGIT 31282 a 0,8 nM	a-TIGIT 31282 a 8 nM
CE_{50} (nM) de unión para el clon a-TIGIT 32959	0,22	0,33	0,37	0,49	0,39
Unión celular de Jurkat TIGIT humano FON (Fold Over Negative - factor sobre negativo) para el clon a-TIGIT 32959	588				

Ejemplo 25: Determinación del perfil farmacocinético del clon 31282 después de una sola inyección i.v. en macaco cangrejero

25 Macacos cangrejeros recibieron IgG1 o IgG4 del clon a-TIGIT 31282 mediante una inyección en embolada i.v. El anticuerpo se administró a 3 concentraciones diferentes (0,1 mg/kg; 1 mg/kg; 10 mg/kg) a 2 animales (1 macho y 1 hembra). Se recogió sangre durante 504 horas después de la dosis en el día 1. Las muestras de sangre se procesaron para el plasma y se analizaron para la concentración de IgG1 o IgG4 de clon a-TIGIT 31282 usando un método ELISA. Se usaron los datos de concentración plasmática-tiempo de animales individuales para calcular los valores de parámetros toxicocinéticos para IgG1 e IgG4 del clon a-TIGIT 31282 después de dosificación IV usando el modelo intravascular en Phoenix WinNonlin (versión 6.3, Pharsight, una empresa Certara, Princeton, NJ).

30

35 Despues de la dosificación en embolada IV de IgG1 e IgG4 del clon a-TIGIT 31282 a 0,1, 1 y 10 mg/kg, las concentraciones de IgG1 eran cuantificables en plasma de monos macho y hembra durante 240 h, 336 h y 504 h después de la dosis, respectivamente, e IgG4 era cuantificable durante 168 h, 240 h y 504 h, respectivamente (figura 29 y tabla 27). No hubo diferencias aparentes relacionadas con el sexo en la exposición sistémica (Cmáx y ABCúltima) a IgG1 y IgG4 después de dosificación en embolada i.v. de IgG1 o IgG4 del clon a-TIGIT 31282, con

40

relaciones (machos/hembras) que varían de 0,855 a 1,16.

Después de la dosificación en embolada i.v. de IgG1 del clon a-TIGIT 31282 a monos macho y hembra, las concentraciones plasmáticas de IgG1 disminuyeron de manera bifásica a todos los niveles de dosis, variando la media de la semivida terminal ($t_{1/2}$) de 84,7-174 h (figura 29). La eliminación sistémica (Systemic Clearance - CL) fue constante entre las dosis estudiadas, variando de 0,280 a 0,392 ml/h/kg. El volumen aparente de distribución en estado de equilibrio (V_{ss}) fue constante entre los niveles de dosis ensayados, con valores que varían de 53,7-66,5 ml/kg. Los aumentos de 10 veces en la dosis de IgG1 del clon a-TIGIT 31282 en el intervalo de 0,1 a 1 mg/kg y de 1 a 10 mg/kg provocaron aumentos aproximadamente proporcionales en la exposición (aumentos de 9,57 a 14,5 veces).

Después de la administración i.v. de IgG4 del clon a-TIGIT 31282 a monos macho y hembra, las concentraciones plasmáticas de IgG4 disminuyeron de manera bifásica a todos los niveles de dosis ensayados, con $t_{1/2}$ de 148-334 h (figura 29 y

tabla 28). La CL fue constante entre los niveles de dosis ensayados, variando de 0,160 a 0,219 ml/h/kg. La media de V_{ss} varió de 41,2-70,7 ml/kg. Los aumentos de 10 veces en la dosis de IgG4 del clon a-TIGIT 31282 en el intervalo de 0,1 a 1 mg/kg y de 1 a 10 mg/kg provocaron aumentos aproximadamente proporcionales en la exposición a IgG4 (aumentos de 9,32 a 12,5 veces).

Tabla 27: Resumen de la media de los parámetros toxicocinéticos para IgG1 humana del clon a-TIGIT 31282 después de embolada i.v. en macaco cangrejero

IgG1 humana del clon a-TIGIT 31282			
Dosis (mg/	0,1	1	10
$C_{máx}$ (ug/ml)	2,34	22,4	268
$t_{máx}$ (h)	1	1	1
$ABC_{última}$ (h*ug/ml)	224	2330	33700
$t_{1/2}$ (h)	174	84,7	
Cl (ml/h/kg)	0,292	0,392	0,280
V_{ss} (ml/kg)	66,5	57,2	53,7

Tabla 28: Resumen de la media de los parámetros toxicocinéticos para IgG4 humana del clon a-TIGIT 31282 después de embolada i.v. en macaco cangrejero

IgG4 humana del clon a-TIGIT 31282			
Dosis (mg/kg)	0,1	1	10
$C_{máx}$ (ug/ml)	2,81	26,2	283
$t_{máx}$ (h)	1	1	1
$ABC_{última}$ (h*ug/ml)	238	2690	39100
$t_{1/2}$ (h)	251	334	182
Cl (ml/h/kg)	0,190	0,160	0,216
V_{ss} (ml/kg)	65,7	70,7	57,5

Ejemplo 26: Caracterización de la expresión de TIGIT en poblaciones de células tumorales humanas

Se realizaron análisis por citometría de flujo para evaluar la expresión de TIGIT en linfocitos T y B normales y tumorales en muestras de sangre de pacientes con cáncer con diferente indicación de cáncer hemático.

Se ensayaron muestras de pacientes con síndrome de Sézary para comparar la expresión de TIGIT en poblaciones de linfocitos T CD4+ malignas y normales. Para separar estas poblaciones, se realizó una determinación previa del reordenamiento del clon maligno TCR-Vb usando el kit de repertorio TCR-Vb Beckman Coulter (n.º IM3497). Una vez identificado el clon maligno, se realizó el perfil de expresión de TIGIT en inmunocitos de pacientes con síndrome de Sézary usando los siguientes reactivos comerciales: anti-CD3 Krome Orange (n.º B00068), anti-CD4-PE(n.º A07751), anti-CD8-PC7 (n.º 737661), anti-CD56-PC5 (n.º A07789), anti-CD45-Pacific Blue (n.º A74763), anti-CD19-

AF750 (n.ºA94681) y anti-Vb8-FITC (n.º IM1233) (todos de Beckman-Coulter) y anti-TIGIT-APC (clon MBSA43, eBiosciences n.º 17-9500-42). Los análisis por citometría de flujo de muestras de pacientes con síndrome de Sézary se realizaron en un aparato CytoFlex (Beckman-Coulter). Los datos se analizaron con el programa informático FloJo (FlowJo, LLC).

- 5 Se muestra un ejemplo representativo en la figura 30A. La estrategia de selección para este donador que tiene el clon TCR-Vb8 maligno se muestra en la figura 30A siendo las células malignas CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁺ y siendo los linfocitos T CD4+ normales CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁻. Se observa una fuerte expresión de TIGIT en los linfocitos T CD4+ malignos en comparación con los linfocitos T CD4+ normales (MFI respectiva de 4987 y 999) (figura 30B).
- 10 Asimismo, se realizaron análisis por citometría de flujo para evaluar la expresión de TIGIT en linfocitos B normales y malignos en muestras de médula ósea de pacientes con CLL. Las muestras se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), anti-CD45-BB515 (clon HI30, BD Horizon 564585), anti-CD5-BV510 (clon UCHT2, Biolegend 363381), anti-CD19-BV711 (clon SJ25C1, BD Horizon 563036) y anti-TIGIT-PE (clon 15 MBSA43, eBioscience E13456-108). La adquisición se realizó en FACS Fortessa (BD Biosciences) y se analizó con el programa informático FlowJo (FlowJo, LLC). Las células viables se seleccionaron en dispersión directa y lateral. Se seleccionaron diversos subconjuntos de la siguiente manera: CD45⁺ CD19⁺ CD5⁻ (linfocitos B normales) y CD45⁺ CD19⁺ CD5⁺ (B-CLL malignos).
- 20 Se muestra un ejemplo representativo en la figura 31 con la estrategia de selección ilustrada en la figura 31A. Una alta proporción de linfocitos B-CLL malignos son positivos para TIGIT (75 %), en contraste con los linfocitos B normales (1 %) (MFI de 1440 y 810, respectivamente) (figura 31B).

25 En general, los datos obtenidos demuestran que las células tumorales expresan TIGIT en indicaciones específicas de cáncer hemático.

Ejemplo 27: Actividad antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT en monoterapia en modelo de linfocitos T de ratón.

30 Para este experimento, Se manipularon células de linfoma de linfocitos T EL4 (ATCC® TIB-39™) para que expresaran de forma estable TIGIT de ratón (EL4-mTIGIT). Se usaron células EL4 transducidas con un vector similar que codificaba GFP como control (EL4-GFP). Las combinaciones de células se subclonaron para obtener los clones de EL4-mTIGIT y EL4-GFP. El anticuerpo anti-TIGIT usado fue una versión modificada del anticuerpo 29527 (modificado de modo que el residuo 27 de FR3 de VH esté mutado de L a V y donde el residuo 6 de FR4 de VH está mutado de M a T) y producido en un isótipo IgG1 humana. Se inocularon ratones Balb/c hembra de 8 semanas con 1 000 000 células EL4-mTIGIT o 200 000 células EL4-GFP por vía subcutánea. En el día 7 después de la inoculación, cuando los volúmenes de los tumores eran de promedio de aproximadamente 110 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento con un volumen de tumor igual (n = 15 por grupo para EL4-mTIGIT y n = 10 por grupo para EL4-GFP). Los ratones se trataron con 200 µg de anticuerpo anti-TIGIT o anticuerpo de control de isótipo (hlgG1, BioXcell) mediante inyecciones intraperitoneales en el día 7, el día 10, el día 13 y el día 40 16 después de la inoculación del tumor. El crecimiento tumoral se controló y se midieron los volúmenes de los tumores con calibres electrónicos tres veces a la semana desde el día 7 hasta el día 26. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió de 2000 mm³. Las curvas de crecimiento tumoral se analizaron estadísticamente mediante un modelo mixto lineal. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se evaluaron 45 ensayando la interacción del tiempo*grupo de tratamiento.

50 La figura 32 ilustra las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados con EL4-mTIGIT (A-C) o EL4-GFP (D-F). Se representan las curvas de la mediana de crecimiento tumoral (A y D), así como las curvas de crecimiento tumoral individuales para ratones tratados con control de isótipo hlgG1 (B y E) o Ab antagonista a-TIGIT (C y F). En ratones 55 inoculados con células EL4-mTIGIT, hubo una supresión significativa del crecimiento tumoral cuando se trataban con Ab anti-TIGIT en comparación con el grupo tratado con el control de isótipo (p<0,001). Mientras que en el grupo tratado con anticuerpo de control de isótipo, 3 de los 15 ratones demostraron un control del crecimiento tumoral con un volumen por debajo de 700 mm³ al final del modelo, este número se aumentó hasta 8 de los 15 ratones en el grupo tratado con anticuerpo antagonista anti-TIGIT. No se pudo observar eficacia antitumoral o respuesta completa en ratones que albergaban tumor EL4-GFP cuando se comparaba el tratamiento con antagonista a-TIGIT con el anticuerpo de control de isótipo. Conjuntamente, estos datos demuestran que el anticuerpo antagonista a-TIGIT (hlgG1) tiene eficacia antitumoral significativa en un modelo con células tumorales que expresan TIGIT.

Ejemplo 28: Actividad antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT en combinación con anticuerpos del punto de control inmunitario en modelos de ratón de carcinoma de colon CT26

60 Además de la combinación de Ab anti-TIGIT con un anticuerpo anti-PD1 (ejemplo 12, 13 y 14), la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-TIGIT también se evaluó en combinación con anticuerpos agonistas específicos para las moléculas coestimuladoras 4-1BB, OX40 y GITR, así como con un anticuerpo antagonista específico para la molécula inhibidora del punto de control ICOS.

La línea celular tumoral CT26 se adquirió de ATCC® (CRL-2638™). Ratones balb/c hembra de 8 semanas se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 500 000 células. En el día 9 después de la inoculación, cuando los volúmenes de los tumores eran de promedio de aproximadamente 75 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento con un volumen de tumor igual (n = 10 ratones por grupo). Todos los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal cada 3 días empezando en el día de la asignación aleatoria para un total de 3 inyecciones. El anticuerpo anti-TIGIT usado fue una versión modificada del anticuerpo 29527 (modificado de modo que el residuo 27 de FR3 de VH esté mutado de L a V y donde el residuo 6 de FR4 de VH está mutado de M a T) y producido en un isótipo IgG2a de ratón, que se administró a 20 µg/ratón. El anticuerpo anti-4-1 BB (clon 3H3, BioXCell, BE0239) se administró a 5 µg/ratón, a-OX-40 (clon OX-86, BioXCell, BE0031) se administró a 20 µg/ratón, a-GITR (clones DTA-1, BioXCell, BE0063) se administró a 10 µg/ratón; y a-ICOS (clon 7E.17G9, BioXCell, BE0059) se administró a 200 µg/ratón. El crecimiento tumoral se controló y se midieron los volúmenes de los tumores con calibres electrónicos tres veces a la semana desde el día 7 hasta el día 35. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió de 2000 mm³. Las curvas de crecimiento tumoral se analizaron estadísticamente mediante un modelo mixto lineal sobre volúmenes de tumor transformados logarítmicamente. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se evaluaron ensayando la interacción del tiempo*grupo de tratamiento. Esto provocó un buen ajuste del modelo para la inmensa mayoría de los datos, excepto por los volúmenes de tumor muy pequeños (por debajo de 10 mm³). Por lo tanto, estos pequeños volúmenes de tumor se trataron como valores ausentes. Para ensayar un efecto sinérgico que surge de combinar el anticuerpo anti-TIGIT con el anticuerpo del punto de control de inmunitario correspondiente (IC - es decir, anti-41BB, anti-OX40, anti-GITR y anti-ICOS), los grupos de tratamiento se recodificaron mediante una combinación de dos variables; anti-TIGIT (sí/no) e IC (sí/no). Un efecto sinérgico, por encima del efecto aditivo de cada tratamiento (anti-TIGIT*tiempo e IC*tiempo) se evaluó ensayando el término de interacción anti-TIGIT*IC*tiempo.

La figura 33A muestra las curvas de la mediana de crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o en combinación con anticuerpo anti-4-1BB. Hubo una supresión significativa del crecimiento tumoral en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT + anti-4-1BB en comparación con monoterapia anti-TIGIT o anti-4-1BB (p = 0,0005 y p < 0,0001 respectivamente). La combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-4-1BB provocó que 6/10 ratones mostraran una respuesta completa (donde el tumor es <30 mm³ y se consideró no medible), en comparación con 1/10 o 0/10 respuestas completas en grupos tratados respectivamente con anticuerpo a-TIGIT o a-4-1BB como agente único. Estos datos demuestran la eficacia antitumoral significativa del tratamiento anti-TIGIT en combinación con anticuerpo anti-4-1BB para el tratamiento de tumores preestablecidos.

La figura 33B muestra las curvas de la mediana de crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o en combinación con anticuerpo anti-OX-40. Hubo una supresión significativa del crecimiento tumoral en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT + anti-OX-40 en comparación con monoterapia anti-TIGIT o anti-OX-40 (p = 0,0002 y p < 0,0001 respectivamente). La combinación de anticuerpo anti-TIGIT + anti-OX-40 consiguió una eficacia antitumoral sinérgica que fue mayor que el efecto aditivo de ambos tratamientos de monoterapia (p = 0,02). La combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-OX-40 provocó que 7/10 ratones mostraran una respuesta completa en comparación con 1/10 o 0/10 respuestas completas en grupos tratados respectivamente con anticuerpo a-TIGIT o a-OX-40 como agente único. Estos datos demuestran la eficacia antitumoral significativa y sinérgica del tratamiento anti-TIGIT en combinación con anticuerpo anti-OX-40 para el tratamiento de tumores preestablecidos.

La figura 33B muestra las curvas de la mediana de crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o en combinación con anticuerpo anti-GITR. Hubo una supresión significativa del crecimiento tumoral en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT + anti-GITR en comparación con monoterapia anti-TIGIT o anti-GITR (p < 0,0001). La combinación de anticuerpo anti-TIGIT + anti-GITR consiguió una eficacia antitumoral sinérgica que fue mayor que el efecto aditivo de ambos tratamientos de monoterapia (p = 0,01). La combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-GITR provocó que 6/10 ratones mostraran una respuesta completa en comparación con 1/10 o 0/10 en grupos tratados respectivamente con anticuerpo anti-TIGIT o anti-GITR como agente único. Estos datos demuestran la eficacia antitumoral significativa y sinérgica del tratamiento anti-TIGIT en combinación con anticuerpo anti-GITR para el tratamiento de tumores preestablecidos.

La figura 33B muestra las curvas de la mediana de crecimiento tumoral por grupo, así como las curvas de crecimiento individuales para ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT en monoterapia o en combinación con anticuerpo anti-ICOS. Hubo una supresión significativa del crecimiento tumoral en ratones tratados con anticuerpo anti-TIGIT + anti-ICOS en comparación con monoterapia anti-TIGIT o anti-ICOS (p = 0,003 y p = 0,0001 respectivamente). La combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-ICOS provocó que 1/10 ratones mostraran una respuesta completa (donde el tumor es <30 mm³ y se consideró no medible), en comparación con 1/10 o 0/10 en grupos tratados respectivamente con anticuerpos anti-TIGIT o anti-ICOS como agente único. Estos datos demuestran la eficacia antitumoral significativa y sinérgica del tratamiento anti-TIGIT en combinación con anticuerpo anti-ICOS para el tratamiento de tumores preestablecidos.

Ejemplo 29: Actividad de anticuerpo antagonista anti-TIGIT sobre linfocitos T γδ

Los linfocitos T $\gamma\delta$ (gamma-delta, o g/d) son una población de linfocitos T no convencionales con actividad antitumoral descrita (Zhao *et al.* 2018. *J Transl Med.* 16:122) y actividad antivírica (por ejemplo, infección por CMV) y también se han implicado en enfermedades autoinmunitarias (Malik S *et al.* 2016. *Front Immunol.* 7:14).

- 5 Se realizaron análisis por citometría de flujo para evaluar la expresión de TIGIT en linfocitos T $\gamma\delta$ en PBMC recién aislados de individuos sanos con un estado seronegativo o seropositivo para citomegalovirus (CMV) (el estado de CMV se evaluó por EFS Nouvelle Aquitaine, Burdeos, Francia). Las células se tiñeron según las instrucciones del fabricante usando tampón FACS filtrado (PBS + EDTA 2 mM + BSA al 0,1 %). La adquisición se realizó en FACS 10 Fortessa (BD Biosciences) y se analizó con el programa informático BD FACS DIVA (BD Biosciences). Las células se seleccionaron por dispersión directa y lateral y viabilidad. Los linfocitos T $\gamma\delta$ se seleccionaron de la siguiente manera: CD3 $^+$ TCR $\gamma\delta^+$ V $\delta2^+$ (linfocitos T V $\delta2^+$ $\gamma\delta$) usando los siguientes anticuerpos: anti-TCR $\gamma\delta$ APC, clon REA591 n.º 130-109-280 de Miltenyi; anti-TCR V $\delta2$ -PE-Vio 770, clon REA771, n.º 130-111-012 de Miltenyi; BV421 de ratón anti-CD3 humano, clon UCHT1, n.º 560365 de BD Biosciences; kit viable Zombie Aqua Fixable, n.º 423101 de Biolegend.
- 15

Similares a los linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales, los linfocitos T V $\delta2^+$ $\gamma\delta$ no convencionales expresan TIGIT en poblaciones humanas tanto negativas como positivas a CMV (anti-TIGIT, clon MBSA43, n.º 12-98500-42 de eBioscience) (figura 34A). Para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor TIGIT en esta población de células, linfocitos T V $\delta1^+$ $\gamma\delta$ aislados magnéticamente (anti-TCR V $\delta1$ -FITC, clon REA173 n.º 130-100-532 y microesferas anti-FITC n.º 130-048-701 ambos de Miltenyi) o PBMC totales de donadores positivos para CMV se activaron con anti-V $\delta1$ (10 ug/ml) (clon R9.1, n.º IM1761 de Beckman Coulter) e IL-15 (20 ng/ml), (n.º 200-15-50UG de Peprotech), se añadió adicionalmente IL-2 (100 U/ml, n.º 200-02-1MG Peprotech) a los linfocitos T V $\delta1^+$ $\gamma\delta$ aislados, en presencia o ausencia de ligando CD155 de TIGIT (n.º 9174-CD-050 de R&D Systems). La figura 34B muestra una disminución dependiente de la dosis en la secreción de IFNy (kit ELISA, n.º 3420-1h-20 de Mabtech) mediada por la adición de ligando CD155 de TIGIT (0, 0,1, 1 y 10 ug/ml) con una inhibición máxima alcanzada a 1 ug/ml de CD155. La adición del clon 31282 de Ab anti-TIGIT (10 ug/ml) restaura completamente la producción de IFNy a un nivel igual o mayor a la condición sin ligando CD155, mientras que el control de isotipo IgG1 humana tiene efecto muy limitado. La figura 34C demuestra un efecto inhibidor similar mediado por CD155 (10 μ g/ml) después de 20 activación anti-V $\delta1$ de los PBMC totales y una restauración total de la secreción de IFNy cuando se añade un clon 25 31282 a-TIGIT a la mezcla. Estos datos demuestran que, similares a los linfocitos T $\alpha\beta$, la actividad de los linfocitos T $\gamma\delta$ puede alterarse por ligamiento de CD155 a TIGIT y que los anticuerpos anti-TIGIT evitan completamente esta 30 inhibición.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TIGIT humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:
- 5 HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16 (YTFTSYYMH),
 HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
 HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
 10 LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
 LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), and
 LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63 (QQYFSPPWT).
- 15 2. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una combinación de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 221 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 222 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 20 3. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una combinación de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 219 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 220 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 25 4. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es un anticuerpo IgG humano, preferiblemente un anticuerpo IgG1 humano.
- 30 5. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que reduce selectivamente los linfocitos Treg que expresan TIGIT.
- 35 6. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que disminuye la expresión de TIGIT en linfocitos T CD8 y/o en linfocitos Treg induciendo la internalización de TIGIT.
- 40 7. Un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a TIGIT humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:
- 45 HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 16 (YTFTSYYMH),
 HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
 HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
 LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
 LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), and
 LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 63 (QQYFSPPWT).
- 50 8. Un polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados que codifica un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo anti-TIGIT, en el que el polinucleótido aislado o combinación de polinucleótidos aislados comprende la SEQ ID NO: 251 y la SEQ ID NO: 252.
- 55 9. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en tratamiento.
- 60 10. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
- 65 11. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y administrar además uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 70 12. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el uno o más agentes terapéuticos

se seleccionan de: un agente quimioterápico, un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-GITR y un anticuerpo anti-ICOS.

Figura 1 – secuencias CDR de VH

Anticuerpo	CDR1 de VH	SEQ ID NO:	CDR2 de VH	SEQ ID NO:	CDR3 de VH	SEQ ID NO:
26518	FTFSSYGM	1	NIKQDGSEKYYVDSVKG	2	ARVSYYYDSSKLRWALEYFQH	3
29478	FTFESYGMV	4	SILYDGSNRYYADSVKG	5	ARVSYYYDSVELRWALEYFQH	6
26452	YTFTSYYMH	7	VINPSGGSTSYAQKFQG	8	ARDHSDDYWSGILDV	9
29487	YTFEKYYMH	10	VIGPSGASTSYAQKFQG	11	ARDHSDDYWSGILHS	12
29489	YTFTSYYMH	13	VIGPSGASTSYAQKFQG	14	ARDHSDDYWSGIMEV	15
31282	YTFTSYYMH	16	VIGPSGASTSYAQKFQG	17	ARDHSDDYWSGIMEV	18
26486	YSISSGYYWA	19	SIYHSGSTYYNPSLKS	20	AIEGANYYDFGYVAFDI	21
29494	GSISSGYYLA	22	SIFRSGSTYYNPSLES	23	AIEGANFKDFGYVAFDI	24
29499	GSISSSRYYWA	25	SIGTSGSTYYNPSLKS	26	AIEGANFRDFGYVAFDI	27
26521	GTFSSYAI	28	GLIPIFGTANYAQKFQG	29	ARLHLGSSAYYGMDV	30
29513	GTFQNYAI	31	VIVPIFGTANYAQKFQG	32	ARLHLGQKAYYGMDV	33
26493	FTFGDYAMH	34	GITWNNSGSIGYADSVKG	35	AKPVPKSRLGLDV	36
29520	FTFRDYAMH	37	GITWNNSGLIGYADSVKG	38	AKPVPRRLRGLDV	39
29523	FTFGSYYMH	40	VIVPDGSNKLYADSVKG	41	AKPVPKSRA LDV	42
29527	FTFSSSYMH	43	VIGADGSNKYYADSVEG	44	AKPVPRRRGLDV	45
31288	GSISSGYYLA	271	SIFRSGSTYYNPSLES	272	AIEGANFKDFGYVAFDI	273
32919	GSISSGYYLA	274	SIFRSGSTYYNPSLES	275	AIEGANFKDFGYVAFDI	276
32931	GSISSGYYLA	277	SIFRSGSTYYNPSLES	278	AIEGANFKDFGYVAFDI	279
26432	GTFSSYAI	280	GLIPIFGTANYAQKFQG	281	AREAQSRYVPDFI	282
32959	GTFSSYLS	353	GIYPIFATANYAQKFQG	354	AREAQSRYVPDFI	355

Figura 2 – secuencias CDR de VL

Anticuerpo	CDR1 de VL	SEQ ID NO:	CDR2 de VL	SEQ ID NO:	CDR3 de VL	SEQ ID NO:
26518	RASQSVSSYLA	46	DASKRAT	47	QQVHNFPQT	48
29478	RASQSVSSYLA	49	DASKRAT	50	QQVHNFPQT	51
26452	RASQSVRSSYLA	52	GASSRAT	53	QQYFSPPW	54
29487	RASQSVRSSYLA	55	GASSRAT	56	QQYFSPPW	57
29489	RASQSVRSSYLA	58	GASSRAT	59	QQYFSPPW	60
31282	RASQSVRSSYLA	61	GASSRAT	62	QQYFSPPW	63
26486	RASQSVSSNLA	64	GASTRAT	65	QQSPPWPR	66
29494	RASQSVSSNLA	67	GASTRAT	68	QQSPPWPR	69
29499	RASQSVSSNLA	70	GASTRAT	71	QQSPPWPR	72
26521	RASQSISSYLN	73	AASSLQS	74	QQRYVFPPT	75
29513	RASQSISSYLN	76	AASSLQS	77	QQRYVFPPT	78
26493	RASQGISSWLA	79	GASSLQS	80	QQAFYLPWT	81
29520	RASQGISSWLA	82	GASSLQS	83	QQAFYLPWT	84
29523	RASQGISSWLA	85	GASSLQS	86	QQAFYLPWT	87
29527	RASQGISSWLA	88	GASSLQS	89	QQAFYLPWT	90
31288	RASQSVSSNLA	283	GASTRAT	284	QQSPPWPR	285
32919	RASQSVSSYLA	286	DASN RAT	287	QQENPRPR	288
32931	RASKSVSSNLA	289	FASTRAT	290	QQTSPWPR	291
26432	RASQSVSSNLA	292	GASTRAT	293	QQYAIWPPFT	294
32959	RASQSVSSNLA	356	GASTRAT	357	QQYAIWPPFT	358

Figura 3 – secuencias FR de VH

Anticuerpo	FR1 de VH	SEQ ID NO:	FR2 de VH	SEQ ID NO:	FR3 de VH	SEQ ID NO:	FR4 de VH	SEQ ID NO:
26518	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASG	91	WVRQAPGKGLEWVA	92	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYC	93	WGQGTL VTVSS	94
29478	EVQLVESGGGVQPG RSLRLSCAASG	95	WVRQAPGKGLEWVA	96	RFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYC	97	WGQGTL VTVSS	98
26452	QVQLVQSGAEVKPG ASVKVSCKASG	99	WVRQAPGQGLEWMG	100	RVTMTRDTSTSTVYMEELSSL RSEDTAVYYC	101	WGQGTM VTVSS	102
29487	QVQLVQSGAEVKPG ASVKVSCKASG	103	WVRQAPGQGLEWMG	104	RVTMTRDTSTSTVYMEELSSL RSEDTAVYYC	105	WGQGTM VTVSS	106
29489	QVQLVQSGAEVKPG ASVKVSCKASG	107	WVRQAPGQGLEWMG	108	RVTLTRDTSTSTVYMEELSSL RSEDTAVYYC	109	WGQGTM VTVSS	110
31282	QVQLVQSGAEVKPG ASVKVSCKASG	111	WVRQAPGQGLEWMG	112	RVTLTRDTSTSTVYMEELSSL RSEDTAVYYC	113	WGQGTT VTVSS	114
26486	QVQLQESGPGLVVKPS ETLSLTCAVSG	115	WIRQPPGKGLEWIG	116	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	117	WGQGTM VTVSS	118
29494	QVQLQESGPGLVVKPS ETLSLTCTVSG	119	WIRQPPGKGLEWIG	120	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	121	WGQGTM VTVSS	122
29499	QLQLQESGPGLVVKPS TLSLTCTVSG	123	WIRQPPGKGLEWIG	124	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT ATDTAVYYC	125	WGQGTM VTVSS	126
26521	QVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASG	127	WVRQAPGQGLEWMG	128	RVTITADESTSTAYMEELSSL SEDATAVYYC	129	WGQGTT VTVSS	130
29513	QVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASG	131	WVRQAPGQGLEWMG	132	RVTVTADESTSTAYMEELSSL RSEDTAVYYC	133	WGQGTT VTVSS	134
26493	EVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	135	WVRQAPGKGLEWWS	136	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTALYYC	137	WGQGTM VTVSS	138
29520	QVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	139	WVRQAPGKGLEWWS	140	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTALYYC	141	WGQGTM VTVSS	142
29523	EVQLVESGGGVQPG RSLRLSCAASG	143	WVRQAPGKGLEWVA	144	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYC	145	WGQGTM VTVSS	146
29527	QVQLVESGGGVQPG RSLRLSCAASG	147	WVRQAPGKGLEWVA	148	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYC	149	WGQGTM VTVSS	150
31288	QLQLQESGPGLVVKPS TLSLTCTVSG	295	WIRQPPGKGLEWIG	296	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	297	WGQGTT VTVSS	298
32919	QLQLQESGPGLVVKPS TLSLTCTVSG	299	WIRQPPGKGLEWIG	300	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	301	WGQGTT VTVSS	302

Figura 3 (cont)

32931	QLQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSG	303	WIRQPPGKGLEWIG AADTAVYYC	304	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT RVTITADESTSTAYMELSSLR	305	WGQGTT VTVSS	306
26432	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	307	WWRQAPGQGLEWMG SEDTAVYYC	308	RVTITADESTSTAYMELSSLR	309	WGQGTM VTVSS	310
32959	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	359	WWRQAPGQGLEWMG SEDTAVYYC	360	RVTITADESTSTAYMELSSLR	361	WGQGTM VTVSS	362

Figura 4 – secuencias FR de VL

Anticuerpo	FR1 de VL	SEQ ID NO:	FR2 de VL	SEQ ID NO:	FR3 de VL	SEQ ID NO:	FR4 de VL	SEQ ID NO:
26518	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	151	WYQQAKPGQAPRLLIY	152	GIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYC	153	FGGGTK VEIK	154
29478	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	155	WYQQAKPGQAPRLLIY	156	GIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYC	157	FGGGTK VEIK	158
26452	EIVLTQSPGTLSLSPGE RATLSC	159	WYQQAKPGQAPRLLIY	160	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC	161	FGGGTK VEIK	162
29487	EIVLTQSPGTLSLSPGE RATLSC	163	WYQQAKPGQAPRLLIY	164	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC	165	FGGGTK VEIK	166
29489	EIVLTQSPGTLSLSPGE RATLSC	167	WYQQAKPGQAPRLLIY	168	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC	169	FGGGTK VEIK	170
31282	EIVLTQSPGTLSLSPGE RATLSC	171	WYQQAKPGQAPRLLIY	172	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC	173	FGGGTK VEIK	174
26486	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	175	WYQQAKPGQAPRLLIY	176	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	177	FGGGTK VEIK	178
29494	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	179	WYQQAKPGQAPRLLIY	180	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	181	FGGGTK VEIK	182
29499	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	183	WYQQAKPGQAPRLLIY	184	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	185	FGGGTK VEIK	186
26521	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITC	187	WYQQAKPGKAPKLLIY	188	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	189	FGGGTK VEIK	190
29513	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITC	191	WYQQAKPGKAPKLLIY	192	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	193	FGGGTK VEIK	194
26493	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTITC	195	WYQQAKPGKAPKLLIY	196	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	197	FGGGTK VEIK	198
29520	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTITC	199	WYQQAKPGKAPKLLIY	200	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	201	FGGGTK VEIK	202
29523	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTITC	203	WYQQAKPGKAPKLLIY	204	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	205	FGGGTK VEIK	206
29527	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTITC	207	WYQQAKPGKAPKLLIY	208	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	209	FGGGTK VEIK	210
31288	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	311	WYQQAKPGQAPRLLIY	312	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	313	FGGGTK VEIK	314
32919	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	315	WYQQAKPGQAPRLLIY	316	GIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYC	317	FGGGTK VEIK	318

Figura 4 (cont)

32931	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	319	WYQQKPGQAPRLIY	320	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	321	GGG GTK VEIK	322
26432	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	323	WYQQKPGQAPRLIY	324	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	325	GGG GTK VEIK	326
32959	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	363	WYQQKPGQAPRLIY	364	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	365	GGG GTK VEIK	366

Figura 5 – secuencias proteínicas del dominio variable

Anticuerpo	Proteína de VH	SEQ ID NO:	Proteína de VL	SEQ ID NO:
26518	EVQLVESGGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSSWR QAPGKGLEWVANIIQDGSEKYYDSVKGGRFTISRDNAKN SLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARVSYYDDSKLRLWAAYFQ HWGQGTLVTVSS	211	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSQVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQVHNFPFLFGGGTKVEIK	212
29478	EVQLVESGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFESYGMVWVR QAPGKGLEW/ASLYDGSNRYYADSVKGRTFVSRDNSK NTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARVSYYDDSVELRWAAYFQ HWGQGTLVTVSS	213	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSQVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQVHNFPFLFGGGTKVEIK	214
26452	QVQLVQSGAEVKKPGASV/KV/SCAKASGYTFTSYMMHWVR QAPGQQGLEWMGVINPSGGSTS/YAQK/FQGRVTMTRDTST STVYMEELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGILDVWGGQ TMVTVSS	215	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSQVRSYSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSL RLEPEDFAVYYCQQYFSPPPWTFGGGTKEIK	216
29487	QVQLVQSGAEVKKPGASV/KV/SCAKASGYTFTSYMMHWVR QAPGQQGLEWMGVIGP/SGASTSYAQK/FQGRVTMTRDTST STVYMEELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGILHSGWGGQ TMVTVSS	217	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSQVRSYSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSL RLEPEDFAVYYCQQYFSPPPWTFGGGTKEIK	218
29489	QVQLVQSGAEVKKPGASV/KV/SCAKASGYTFTSYMMHWVR QAPGQQGLEWMGVIGP/SGASTSYAQK/FQGRVTMTRDTST STVYMEELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGIMEVWGGQ TMVTVSS	219	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSQVRSYSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSL RLEPEDFAVYYCQQYFSPPPWTFGGGTKEIK	220
31282	QVQLVQSGAEVKKPGASV/KV/SCAKASGYTFTSYMMHWVR QAPGQQGLEWMGVIGP/SGASTSYAQK/FQGRVTMTRDTST STVYMEELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGIMEVWGGQ TMVTVSS	221	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSQVRSYSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSL RLEPEDFAVYYCQQYFSPPPWTFGGGTKEIK	222
26486	QVQLQESGPGLVVKPSETLSCAVSGYISSGGYYWAWIR QPPGKGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTVISDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCAIEGANYYDFGY/AFDIWGGQT MVTVSS	223	EIVMTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSQVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTSSL QSEDFAVYYCQQSPPPWTFGGGTKEIK	224
29494	QVQLQESGPGLVVKPSETLSCAVSGYISSGGYYWAWIR QPPGKGLEWIGSIRSGSTYYNPSLESRTVISDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCAIEGANFKDFGY/AFDIWGGQT MVTVSS	225	EIVMTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSQVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTSSL QSEDFAVYYCQQSPPPWTFGGGTKEIK	226

Figura 5 (cont)

29499	QLQQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSRYYWAMI RQPPGKGLEWIGSIGTGSYSTYNNPSLKSRTVTSKRNQ FSLKLSSVTATDTAVYYCAIEGANFRDFGYVAFDIWQGGT MVTVSS	227	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTTEFTLTISSL QSEDFAVYYCQQSPPWPRTFGGGTKEIK	228
26521	QVQLVQSGAEVKKGSSVVKSCKA SG GTFSSYAI SWMR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTADESTS AYMELSSLRSEDTAVYYCARLHLGSSAYYGMDVWGGT TTVSS	229	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQSSISYYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSL QPEDFA TYYCQQRYVFPPTFGGGTKEIK	230
29513	QVQLVQSGAEVKKGSSVVKSCKA SG GTFSSYAI SWMR QAPGQGLEWMGVVPIFGTANYA QKFQGRVTADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLHLGQKAYYYGMDVWGG TTVSS	231	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQSSISYYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSL QPEDFA TYYCQQRYVFPPTFGGGTKEIK	232
26493	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFFGDYAMHW QAPGKGLEWVSGITWNSGSIGYADSVKGRTFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTALYCAKPVPSRGLDVWGQGT MVTVSS	233	DIQLTQSPSSV/SASVGDRVTTICRASQGSSWLA WYQQ KPGKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSL LQPEDFA TYYCQQAFYLPWTFGGGTKEIK	234
29520	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYAMHW QAPGKGLEWVSGITWNSGLIGYADSVKGRTFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTALYCAKPVPSRGLDVWGQGT MVTVSS	235	DIQLTQSPSSV/SASVGDRVTTICRASQGSSWLA WYQQ KPGKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSL LQPEDFA TYYCQQAFYLPWTFGGGTKEIK	236
29523	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFGSYMMHW QAPGKGLEWAVWVMPDSNKLYADSVKGRTFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTALYCAKPVPSRGLDVWGQGT MVTVSS	237	DIQLTQSPSSV/SASVGDRVTTICRASQGSSWLA WYQQ KPGKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSL LQPEDFA TYYCQQAFYLPWTFGGGTKEIK	238
29527	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYMMHW QAPGKGLEWAVIGADGSNKYYADSVKGRTFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTALYCAKPVPSRGLDVWGQGT MVTVSS	239	DIQLTQSPSSV/SASVGDRVTTICRASQGSSWLA WYQQ KPGKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSL LQPEDFA TYYCQQAFYLPWTFGGGTKEIK	240
31288	QLQQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYI LWIGSIFRSGSTYNNPSLESRTVSDTSKNQFSLK VYCAIEGANFKDGYVAFDIWQGGTT VSS	327	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQ QSPPWPRTFGGGTKEIK	328
32919	QLQQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYI LWIGSIFRSGSTYNNPSLESRTVSDTSKNQFSLK VYCAIEGANFKDGYVAFDIWQGGTT VSS	329	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQ ENPRPRTFGGGTKEIK	330
32931	QLQQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYI LWIGSIFRSGSTYNNPSLESRTVSDTSKNQFSLK VYCAIEGANFKDGYVAFDIWQGGTT VSS	331	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQ QTSPPWPRTFGGGTKEIK	332

Figura 5 (cont)

26432	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAKSGGTFSYYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFGGRVTITADESTSTAYMELSSLR EDTAVYYCAREAQSYRVPFDIWGQGTMVTVSS	333	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QYAIWPPFTFGGTKEIK	334
32959	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAKSGGTFSYYAISWVRQAPGQ LEWMGGIPIFATANYAQKFGGRVTITADESTSTAYMELSSRSE DTAVYYCAREAQSYRVPFDIWGQGTMVTVSS	367	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QYAIWPPFTFGGTKEIK	368

Figura 6 – secuencias de ADN del dominio variable

SEQ ID NO:	ADN de VH	SEQ ID NO:	ADN de VL
26518	<p>GAGGTGAGCTGGGAGGCTGGTCAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGGGCTCTGGATTTC ACCTTTAGTAGCTGGGAGCTGGTCAGCTGGGAGGCTGGATTTC GGGAAGGGGGTGGAGTGGGAGCTGGCAACATAAAGCAAGATGG AAGTGAAGAAATFACTTAGTGGACTCTGTGAAGGGCCATTAC CATCTCAGAGACAAAGCCCAAGAACTACTGTATCTGAAAT GAACAGGCTGTAGAGGCCAGGACACGGGGTGTACTACTGCG CAGAATCTTCAACACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG TCTCGTCA</p> <p>GAAGTCAGCTGGGGAGAATCTGGGGAGGGCTGGTCAGC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGGGCTGGATTAC CTTCGAGAGGCTATGGCATGGTTGGTCCGGCAGGGCCCCAG AGTAATAGATACTACTGGAGCTGGAGTGGGAGGCTGATTAC GTCTCCAGAGACAATTCCAAAGAACAGCTGTATCTGAAATG AACAGCCTGAGAGCGAGACGGGAGACGGGGTGTACTACTGCG TAGAGTATCTTACTACTAGCACAGGGTTGAGGCTACGATGGG GAAGAATCTTCAACACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG CTCCCTCA</p>	241	<p>GAAATTGGTTGACACAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCCTGAGGGCCAGTCAG AGTGTAGGAGGAGCTACTAGCTGGTACCAACGAAACCTGG CCAGGGCTCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGAGTCACCAAAAGG CCACTGGCAATGCCAGGGTCACTGAGTCAGGGTGTCTGG GACAGACTTCACTCACCATTAGCAGGCCATAGGCTGAAG ATTITGCACTTATTACTGTCAAGCAGGTTCCACAATTCCCTC TCACCTTGGGGAGGGACCAAGGGTGTAGATCAA</p>
29478	<p>GAAGTCAGCTGGGGAGAATCTGGGGAGGGCTGGTCAGC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGGGCTGGATTAC CTTCGAGAGGCTGGAGTGGGAGCTGGAGTGGGAGGCTGGATTAC AGTAATAGATACTACTGGAGCTGGAGTGGGAGGCTGATTAC GTCTCCAGAGACAATTCCAAAGAACAGCTGTATCTGAAATG AACAGCCTGAGAGCGAGACGGGAGACGGGGTGTACTACTGCG TAGAGTATCTTACTACTAGCACAGGGTTGAGGCTACGATGGG GAAGAATCTTCAACACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG CTCCCTCA</p>	243	<p>GAAATTGGTTGACACAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCCTGAGGGCCAGTCAG AGTGTAGGAGGAGCTACTAGCTGGTACCAACGAAACCTGG CCAGGGCTCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGAGTCACCAAAAGG CCACTGGCAATGCCAGGGTCACTGAGTCAGGGTGTCTGG GACAGACTTCACTCACCATTAGCAGGCCATAGGCTGAAG ATTITGCACTTATTACTGTCAAGCAGGTTCCACAATTCCCTC TCACCTTGGGGAGGGACCAAGGGTGTAGATCAA</p>
26452	<p>GAAGTCAGCTGGGAGAATCTGGGGAGGGCTGGTCAGC TGGGGCTCAGTGAGGTTCTCTGAGGCAAGGGCACTGGATAAC CTTCACAGCTACTATACTGACTGGGTGAGCAGGGCCCTGG ACAAGGGGCTTGAAGTGGAGTGGGAGTCATCAACCCCTAGTGGT GTAGCACAAAGTACGGCACAGAAGTTCAGGAGTCAGTCAAC ATGACCAAGGGACAGCTCCAGGAGACAGTCACTGAGAGCT GAGCAGCCTGAGACTGGAGGGGTGTACTACTGCG CCAGAGACCACTGGACTACTGGAGGGAAATCTAGACGTT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGCTCTCCCTCA</p>	245	<p>GAAATTGGTTGACACAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCCTGAGGGCCAGTCAG AGTGTAGGAGGAGCTACTAGCTGGTACCAACGAAACCTGG CCAGGGCTCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGAGTCACCAAAAGG CCACTGGCAATGCCAGGGTCACTGAGTCAGGGTGTCTGG GACAGACTTCACTCACCATTAGCAGGCCATAGGCTGAAG ATTITGCACTTATTACTGTCAAGCAGGTTCCACAATTCCCTC TCACCTTGGGGAGGGACCAAGGGTGTAGATCAA</p>
29487	<p>GAAGTCAGCTGGGAGAATCTGGGGAGGGCTGGTCAGC TGGGGCTCAGTGAGGTTCTCTGAGGCAAGGGCACTGGATAAC CTTCACAGCTACTATACTGACTGGGTGAGCAGGGCCCTGG ACAAGGGGCTTGAAGTGGAGTGGGAGTCATCAACCCCTAGTGGT GTAGCACAAAGTACGGCACAGAAGTTCAGGAGTCAGTCAAC ATGACCAAGGGACAGCTCCAGGAGACAGTCACTGAGAGCT GTAGCACCTGAGACTGGAGGGGTGTACTACTGCG GCCAGAGACCACTGGACTACTGGAGGGAAATCTAGACGTT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGCTCTCCCTCA</p>	247	<p>GAAATTGGTTGACACAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCCTGAGGGCCAGTCAG AGTGTAGGAGGAGCTACTAGCTGGTACCAACGAAACCTGG CCAGGGCTCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGAGTCACCAAAAGG CCACTGGCAATGCCAGGGTCACTGAGTCAGGGTGTCTGG GACAGACTTCACTCACCATTAGCAGGCCATAGGCTGAAG ATTITGCACTTATTACTGTCAAGCAGGTTCCACAATTCCCTC TCACCTTGGGGAGGGACCAAGGGTGTAGATCAA</p>

Figura 6 (cont)

SEQ ID NO:	ADN de VH	ADN de VL
SEQ ID NO:	ADN de VH	ADN de VL
Anticuerpo	<p>CAGGTGCAAGCTGGTCAAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGTTTCTCGCAAGGCATCTGGATACAC</p> <p>CITCACTAGCTACTATAAGCACTGGGTGACAGGCCCTGGACAGGCCATCTGGATACAC</p> <p>ACAGGGCTTGAATGGGGATGGGTCTAGTGGTG</p> <p>CTAGCACAGCTACGGCACAGTTCAGGGCAAGTCTACATGGAGCTG</p> <p>TGACCAAGGGACACGTCAACGAGCACAGTCTACATGGAGCTG</p> <p>AGCAGCCTGAGATCTGAGACACGGGGTACTACTGGAGCT</p> <p>CAGAGACCACACTGGGACTACTGGAGGGATAATGGGGTAT</p> <p>GGGGTCAGGGTACAATGGTACCGGTCCTCTCA</p> <p>CAGGTGCAAGCTGGTCAAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGTTTCTCGCAAGGCATCTGGATACAC</p> <p>CITCACTAGCTACTATAAGCACTGGGTGACAGGCCCTGGACAGGCCATCTGGATACAC</p> <p>ACAGGGCTTGAATGGGGATGGGTCTAGTGGTG</p> <p>CTAGCACAGCTACGGCACAGTTCAGGGCAAGTCTACATGGAGCTG</p> <p>TGACCAAGGGACACGTCAACGAGCACAGTCTACATGGAGCTG</p> <p>AGCAGCCTGAGATCTGAGACACGGGGTACTACTGGAGCT</p> <p>CAGAGACCACACTGGGACTACTGGAGGGATAATGGGGTAT</p> <p>GGGGTCAGGGTACAACCTGTCACCGGTCCTCTCA</p> <p>CAGGTGCAAGCTGGGAGCTGGGCCCCAGGACTGGTGAAGACCTGGGGCCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGTTACT</p> <p>CCATCAGCAGCTGGTTACTACTGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTACCTAG</p> <p>CCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTACCTAG</p> <p>TGGGGACCTACTACAAACCGCTCAAGAACACAGTCTCCCTGAGAC</p> <p>CATATCAGTAGCACAGCTTCAGAACACAGTCTCCCTGAGAC</p> <p>GAGTTCTGACCCGGCGCAAGACACGGGGTGTACTACTGCG</p> <p>CCATAGAAAGGAGTAACTACTACAGACTTGGATATGAGAT</p> <p>TGGACATATGGGGTCAAGGTACAGTGGTACCGGTCCTCTCA</p> <p>CAGGTGCAAGCTGGGAGTCTGGGCCCCAGGACTGGTGAAGACCTGGGGCCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGTTACT</p> <p>CCATCAGCAGCTGGTTACTACTGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTACCTAG</p> <p>CCCCCAAGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTACCTAG</p> <p>GAGTGGGGAGCCTACTACAAACCGCTCCAAAGAACAGTCTCCCTGAG</p> <p>TCACCATATGGTAGACACAGCTGGTACTAC</p> <p>AGCTGAGTTCTGTGACCCGGCGCAAGACACGGGGTGTACTAC</p> <p>TGGCCATAGAAAGGAGTAACTTAAAGGACTTGGATATGAG</p> <p>GCATTCAGTGGTACCGGTCCTCTCA</p>	<p>GAAATTGTTGACGGCAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTTGTCTGTC</p> <p>TCCAGGGAAAAGAGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>AGTGTAGGGAGCTACTTACCTGGTACCCAGGAAAC</p> <p>TGGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGC</p> <p>AGGGCCACTGGCATCCCAAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGT</p> <p>CTGGGAGACAGACTTACCATGGAGCTGAGCTGGAGCT</p> <p>GAAGATTTGCACTGTGATTACTGTCAAGTACTTCACT</p> <p>CCTGGACTTTGGGGAGGGACAAAGGTTGAGATCAA</p> <p>GAAATTGTTGACGGCAGTCTCCAGGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>TCCAGGGAAAAGAGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>AGTGTAGGGAGCTACTTACCTGGTACCCAGGAAAC</p> <p>TGGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGC</p> <p>AGGGCCACTGGCATCCCAAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGT</p> <p>CTGGGAGACAGACTTACCATGGAGCTGAGCTGAGCT</p> <p>GAAGATTTGCACTGTGATTACTGTCAAGTACTTCACT</p> <p>CCTGGACTTTGGGGAGGGACAAAGGTTGAGATCAA</p> <p>GAAATAGTGTGACGGCAGTCTCCAGGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>TCCAGGGAAAAGAGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>AGTGTAGGGAGCTACTTACCTGGTACCCAGGAAAC</p> <p>CCAGGTCCCAAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCACCAAGG</p> <p>GCCACTGTGATCCAGGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTCTG</p> <p>GGACAGAGTTCACTCTCACCATGGAGCTGAGCTGTGAA</p> <p>GATTTCGAGTTTACTGTCACTGGAGTCCCCCTGGCC</p> <p>TAGGACTTTGGGGAGGGACAAAGGTTGAGATCAA</p> <p>GAAATAGTGTGACGGCAGTCTCCAGGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>TCCAGGGAAAAGAGCCACCCCTCTCTGAGGGCCAGTCAG</p> <p>AGTGTAGGGAGCTACTTACCTGGTACCCAGGAAAC</p> <p>CCAGGTCCCAAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCACCAAGG</p> <p>GCCACTGTGATCCAGGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTCTG</p> <p>GGACAGAGTTCACTCTCACCATGGAGCTGAGCTGTGAA</p> <p>GATTTCGAGTTTACTGTCACTGGAGTCCCCCTGGCC</p> <p>TAGGACTTTGGGGAGGGACAAAGGTTGAGATCAA</p> <p>TCA</p>
29489	249	250
31282	251	252
26486	253	254
29494	255	256

Figura 6 (cont)

Anticuerpo	ADN de VH	SEQ ID NO:	ADN de VL	SEQ ID NO:
29499	CAGCTGCACTGCAAGGACTGGGGCCAGGAGCTGGTGAAGGCC TTCGGGAGACCCCTGCTCCCTACCTGCTGCTGGGCTC CATCAGCAGTAGTAGTGGTACTACTGGGGTGGATCGGGCAGC CCCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGAGTATGGAGTATGGGAC GAGTGGGGAGCACCTACTACAAACCGTCCCTCAAGAGTCGAG TCACCATATCCGTAGACACGTCAGAAAGAACCCAGTCTCCCTGA AGCTGAGTTCTGTGAGGACCTAGACAGCGGGGTACTACT GGGCCATAGAAGGAGCTAACCTGGGACTTCGGGATATGTAG CATTCGACATATGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCCTCA CA CAGGGCAGCTGGTCAAGGCTCTGGGCTGAGGTGAAGAACCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGGTCTCTGCAAGGGCTCTGGGAGCA CCTTCAGCAGTAGTGTGCTGGTGGATGGGGATCATCCCTTT GGACAAGGGCTTGGATGGGGATCATCCCTTT GGTACAGCAGAAACTACAGCAGACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGGGGAGCAATCCACAGAGCAGACAGCCATAGGGC TGAGCAGGGCTGTAGATCTGAGGACACGGGACACGGGGTACTACTGC GCTAGGGTTGCACCTGGGATCCACGGGCCTACTACGGCATGGA TGATGGGGGGAGGAAACTCTGGGTCACCGGTCCTCCA CAGGGCAGCTGGTCAAGGCTCTGGGCTGAGGTGAAGAACCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGGTCTCTGCAAGGGCTCTGGGAGCA CCTTCAGCAGACTATGCTATCAGCTGGTGCAGAGGGCCCTG GACAAGGGCTTGGTGGATGGGGTTACGGCTCTATCTTG GTACAGCAGAAACTACAGCAGACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCAG GTTACCGGGAGCAATCCACAGAGCAGACAGCCATAGGGC GAGCAGGCCTGAGATCTGAGGACAGGGGTTACTACTGC CTAGGGTTCAGGGAGCAAGAGGCCTACTACGGCATGGAT GTATGGGGGGAGGAAACTCTGGGTCACCGGTCCTCCA GAAGTGGCAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTACAGCC TGGCAGGGTCCCTGAGACTCTCCCTGTCAGCCCTCTGGATTAC CTTTGGTATTATGCCATGCACTGGGCAAGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGTCTAGGTATTACTGGAAATAGT GTAGCATAGGCTATGGGGACTCTGGTGAAGGGGGGATTACCCA TCTCCAGAGAACGCCAACGCAAGAAACTCCCTGTA ACAGCTGAGAGGCTGAGGACACGGCGTTGTTACTACTGC AAGCCCAAGTGGCCAAAATCTAGAGGGCTAGACGTATGGGTCA GGGTACAATGGTCACCGTCCTCA	257	GAATAAGTGTGATGACGCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTTGTC TCCAGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCCCTGCAAGGGCCAGTCAG AGTGTAGCAGCACTTGGCTGGTACAGCAGAAACCTGG CCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTCATCCACCA GCACTGGTATTCAGGGCTCAGTGGCAGTGGGCTG GGACAGAGCTACTACATGGCAGTCAGCTGGAGTCTGAA GATTTGGCAGTTTACTGTAGGGAGTCCCCCTGGGCC TAGGACTTTGGGGAGGGACCAAGGGTGGAGTCAAA	258
28521	TGGGGAGACAGAGCTCAGCTCCCTGTCATCC CCTTCAGCAGTAGTGTGCTGGTGGATGGGGATCATCCCTTT GGACAAGGGCTTGGATGGGGATCATCCCTTT GGTACAGCAGAAACTACAGCAGACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGGGGAGCAATCCACAGAGCAGACAGCCATAGGGC TGAGCAGGGCTGTAGATCTGAGGACACGGGACACGGGGTACTACTGC GCTAGGGTTGCACCTGGGATCCACGGGCCTACTACGGCATGGA TGATGGGGGGAGGAAACTCTGGGTCACCGGTCCTCCA CAGGGCAGCTGGTCAAGGCTCTGGGCTGAGGTGAAGAACCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGGTCTCTGCAAGGGCTCTGGGAGCA CCTTCAGCAGACTATGCTATCAGCTGGTGCAGAGGGCCCTG GACAAGGGCTTGGTGGATGGGGTTACGGCTCTATCTTG GTACAGCAGAAACTACAGCAGACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCAG GTTACCGGGAGCAATCCACAGAGCAGACAGCCATAGGGC GAGCAGGCCTGAGATCTGAGGACAGGGGTTACTACTGC CTAGGGTTCAGGGAGCAAGAGGCCTACTACGGCATGGAT GTATGGGGGGAGGAAACTCTGGGTCACCGGTCCTCCA GAAGTGGCAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTACAGCC TGGCAGGGTCCCTGAGACTCTCCCTGTCAGCCCTCTGGATTAC CTTTGGTATTATGCCATGCACTGGGCAAGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGTCTAGGTATTACTGGAAATAGT GTAGCATAGGCTATGGGGACTCTGGTGAAGGGGGGATTACCCA TCTCCAGAGAACGCCAACGCAAGAAACTCCCTGTA ACAGCTGAGAGGCTGAGGACACGGCGTTGTTACTACTGC AAGCCCAAGTGGCCAAAATCTAGAGGGCTAGACGTATGGGTCA GGGTACAATGGTCACCGTCCTCA	259	GACATCCAGATGACCCAGTGCCTCCATCCTCCCTGTCATC TGAGGGAGACAGAGCTCAGCTCCCTGTCATCC AGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCCAG GAAGGCCCCCTAAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGGTTTC AAAGTGGGGTCCCCTAAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGGTT GACAGATTTCACACTCAGGGACATCAGCAGTCAGCTGAAG ATTTTGCAACTACTACTGTAGGGAGGAAACTCAGTCTCCCTC CTACITTTGGGGAGGGACCAAGGGTGGAGTCAAA	260
29513	TGGGGAGACAGAGCTCAGCTCCCTGTCATCC CCTTCAGCAGTAGTGTGCTGGTGGATGGGGATCATCCCTTT GGACAAGGGCTTGGATGGGGATCATCCCTTT GGTACAGCAGAAACTACAGCAGACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGGGGAGCAATCCACAGAGCAGACAGCCATAGGGC TGAGCAGGGCTGTAGATCTGAGGACACGGGACACGGGGTACTACTGC GCTAGGGTTCAGGGAGCAAGAGGCCTACTACGGCATGGAT GTATGGGGGGAGGAAACTCTGGGTCACCGGTCCTCCA GAAGTGGCAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTACAGCC TGGCAGGGTCCCTGAGACTCTCCCTGTCAGCCCTCTGGATTAC CTTTGGTATTATGCCATGCACTGGGCAAGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGTCTAGGTATTACTGGAAATAGT GTAGCATAGGCTATGGGGACTCTGGTGAAGGGGGGATTACCCA TCTCCAGAGAACGCCAACGCAAGAAACTCCCTGTA ACAGCTGAGAGGCTGAGGACACGGCGTTGTTACTACTGC AAGCCCAAGTGGCCAAAATCTAGAGGGCTAGACGTATGGGTCA GGGTACAATGGTCACCGTCCTCA	261	GACATCCAGATGACCCAGTGCCTCCATCCTCCCTGTCATC TGAGGGAGACAGAGCTCAGCTCCCTGTCATCC AGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCCAG GAAGGCCCCCTAAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGGTT AAAGTGGGGTCCCCTAAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGGTT GACAGATTTCACACTCAGGGACATCAGCAGTCAGCTGAAG ATTTTGCAACTACTACTGTAGGGAGGAAACTCAGTCTCCCTC CTACITTTGGGGAGGGACCAAGGGTGGAGTCAAA	262
28493	GAAGTGGCAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTACAGCC TGGCAGGGTCCCTGAGACTCTCCCTGTCAGCCCTCTGGATTAC CTTTGGTATTATGCCATGCACTGGGCAAGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGTCTAGGTATTACTGGAAATAGT GTAGCATAGGCTATGGGGACTCTGGTGAAGGGGGGATTACCCA TCTCCAGAGAACGCCAACGCAAGAAACTCCCTGTA ACAGCTGAGAGGCTGAGGACACGGCGTTGTTACTACTGC AAGCCCAAGTGGCCAAAATCTAGAGGGCTAGACGTATGGGTCA GGGTACAATGGTCACCGTCCTCA	263	GACATCCAGATGACCCAGTGCCTCCATCCTCCCTGTCATC TGAGGGAGACAGAGCTCAGCTCCCTGTCATCC AGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCCAG GAAGGCCCCCTAAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGGTT AAAGTGGGGTCCCCTAAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGGTT GACAGATTTCACACTCAGGGACATCAGCAGTCAGCTGAAG ATTTTGCAACTACTACTGTAGGGAGGAAACTCAGTCTCCCTC CTACITTTGGGGAGGGACCAAGGGTGGAGTCAAA	264

Figura 6 (cont)

Figura 6 (cont)

Anticuerpo	ADN de VH	SEQ ID NO:	ADN de VL	SEQ ID NO:
32919	CAGCTGCAGCTGCAGGAGCTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCCTGCCCCACCTGCACGTCTCTGGGGCTCCA TCAGCAGTGGGAGTTACTACTGGGTGGATCTGGAGTATCTTGGAGTG CAGGGAAAGGGGCTGGAGTTGGGAGTGGGGCTGGAGTGGGGCTGGAGTG GGAGGACCACTACTACAAACCCGTCGGAGTGGAGTGGGGCTGGAGTG ATCGGTAGACACGTCGAAGAACCGATTCCCTGAAGGCTGAGT TCTGTGACCGCCGAGACACGGGGGTGTACTACTGGCCATA GAAGGGAGCTAACTTAAAGGACTTTCGGATATGTAAGCATTGACAT ATGGGTCAAGGTACAACTGTCACTGTCACGTCCTCCA	337	GAATTGGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTGGTCTC CAGGGAAAAGAGCCACCCCTCCCTGCAGGGCCAGTAAAG TGTTCAGCAACTTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCAGGGCTCCATATTTCGCACTCCACCGGGCCAC CGGATCCCAAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG AGTCACTCTACCACTACAGCAGCTGAAGTGTGAAGATTTG CAGTTTATTACTGTGAGCAGCTTGGCCCTGGCTTAGGACTT TGGGGAGGGACCAAGGGTTGAGATCAA	338
32931	CAGCTGCAGCTGCAGGAGCTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCCTGCCCCACCTGCACGTCTCTGGGGCTCCA TCAGCAGTGGGAGTTACTACTGGGTGGAGTATCTTGGGGCTGGAGTG CAGGGAAAGGGGCTGGAGTTGGGAGTGGGGCTGGAGTGGGGCTGGAGTG GGAGGACCACTACTACAAACCCGTCGGAGTGGAGTGGGGCTGGAGTG ATCGGTAGACACGTCGAAGAACCGATTCCCTGAAGGCTGAGT TCTGTGACCGCCGAGACACGGGGGTGTACTACTGGCCATA GAAGGGAGCTAACTTAAAGGACTTTCGGATATGTAAGCATTGACAT ATGGGTCAAGGTACAACTGTCACTGTCACGTCCTCCA	339	GAATACTGTGATGACGCGAGTCCAGCCACCCCTGCTGGTCTC CAGGGAAAAGAGCCACCCCTCCCTGCAGGGCCAGTCAGAG TGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCAGGGCTCCATATTTCGCACTCCACCGGGCCAC CTGATTCAGGGCTGGAGTGGGTCTGGGACAG GAGTTCACTCTACCATCAGCAGGCTGAGTCTGAAGATTT GCAAGTTTATTACTGTGAGCAGTAGGCCCATCTGGCCCTCCCTCA CTTTGGGGAGGGACCAAGGGTTGAGATCAA	340
26432	CAGGTGCAGCTGGAGGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGTCTCGGTGAAGGCTCTCTGGAGGCC TTAGCAGCTATGCTATCAGCTGGTGGAGGGATCATCTTGGTA CAAGGGCTTGAGTGGATGGAGGGATCATCTTGGTA CAGCAAACATACGGCACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTAC CGGGGACGAATCCAGGAGCACGGCTACATGGAGCTGAGCAG CCTGAGACTGAGGACACGGGGTGTACTACTGGCCAGAGA GGCTCAATTCCTACAGGGTCCATTGACATATGGGTCAAGGT ACAATGGTACCGTCTCTCA	341	GAATACTGTGATGACGCGAGTCCAGCCACCCCTGCTGGTCTC CAGGGAAAAGAGCCACCCCTCCCTGCAGGGCCAGTCAGAG TGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCAGGGCTCCATATTTCGCACTCCACCGGGCCAC CTGATTCAGGGCTGGAGTGGGTCTGGGACAG GAGTTCACTCTACCATCAGCAGGCTGAGTCTGAAGATTT GCAAGTTTATTACTGTGAGCAGTAGGCCCATCTGGCCCTCCCTCA CTTTGGGGAGGGACCAAGGGTTGAGATCAA	342
32959	CAGGTGCAGCTGGAGGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGTCTCGGTGAAGGCTCTCTGGAGGCC TTAGCAGCTACCTCATCAGCTGGTGGAGGGATCATCTTGGTA CAAGGGCTTGAGTGGATGGAGGGATCATCTTGGTA CAGCAAACATACGGCACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTAC CGGGGACGAATCCAGGAGCACGGCTACATGGAGCTGAGCAG CCTGAGACTGAGGACACGGGGTGTACTACTGGCCAGAGA GGCTCAATTCCTACAGGGTCCATTGACATATGGGTCAAGGT ACAATGGTACCGTCTCTCA	369	GAATACTGTGATGACGCGAGTCCAGCCACCCCTGCTGGTCTC CAGGGAAAAGAGCCACCCCTCCCTGCAGGGCCAGTCAGAG TGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCAGGGCTCCATATTTCGCACTCCACCGGGCCAC CTGATTCAGGGCTGGAGTGGGTCTGGGACAG GAGTTCACTCTACCATCAGCAGGCTGAGTCTGAAGATTT GCAAGTTTATTACTGTGAGCAGTAGGCCCATCTGGCCCTCCCTCA CTTTGGGGAGGGACCAAGGGTTGAGATCAA	370

Figura 7 – Competición con ligando CD155 humano

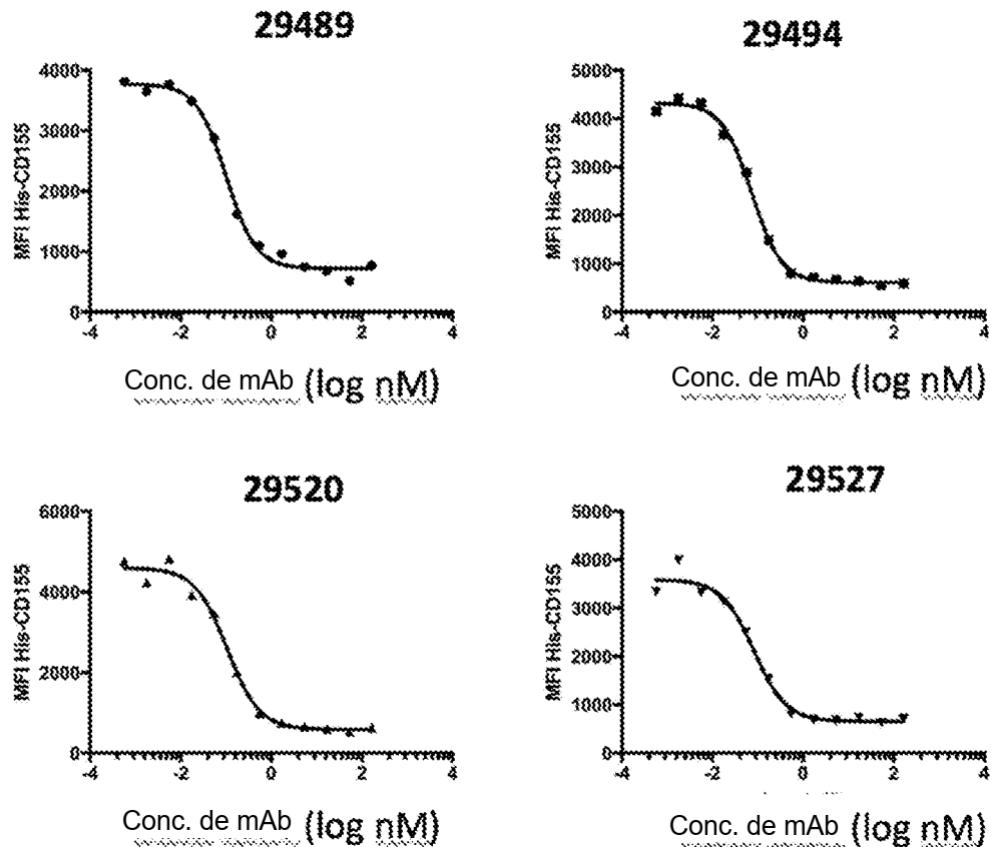


Figura 8 – Expresión de TIGIT en diferentes poblaciones inmunitarias de PBMC de donadores sanos

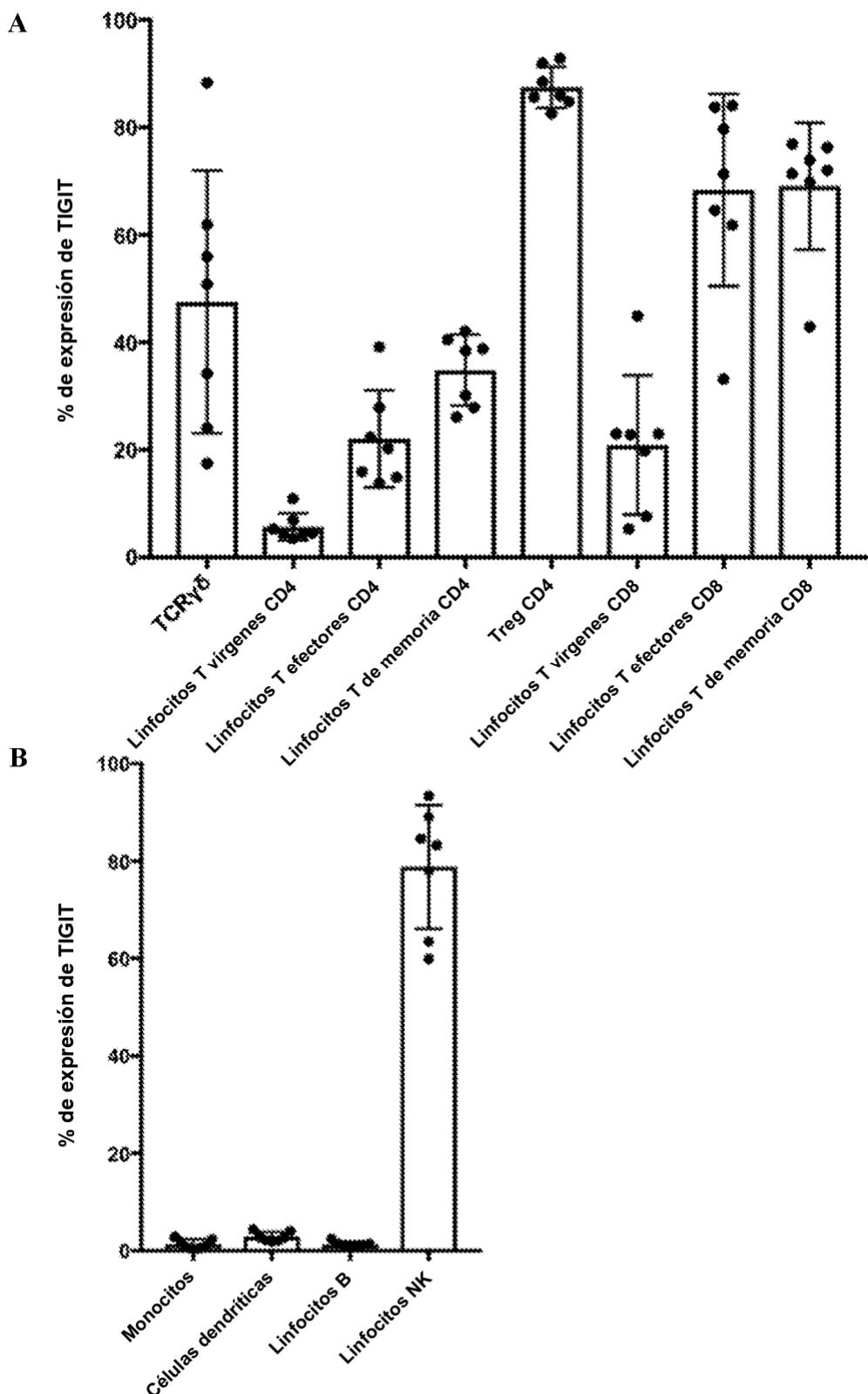


Figura 9 – Unión a Jurkat-hTIGIT

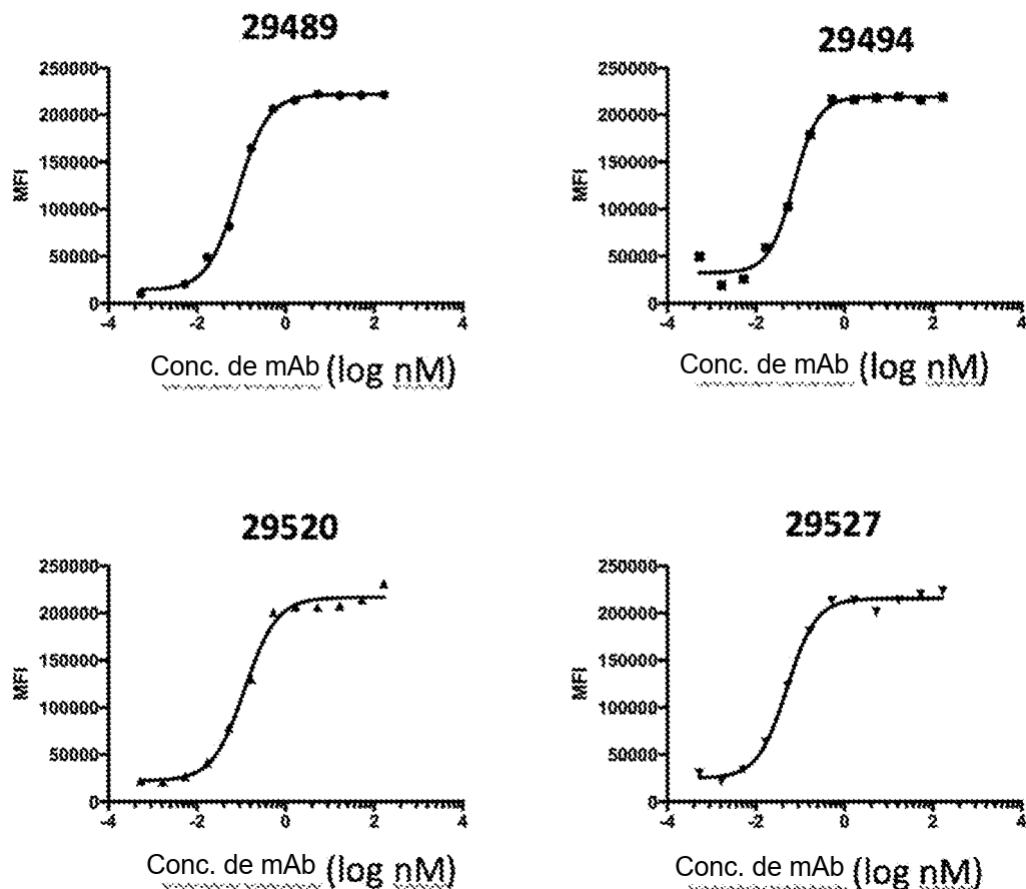


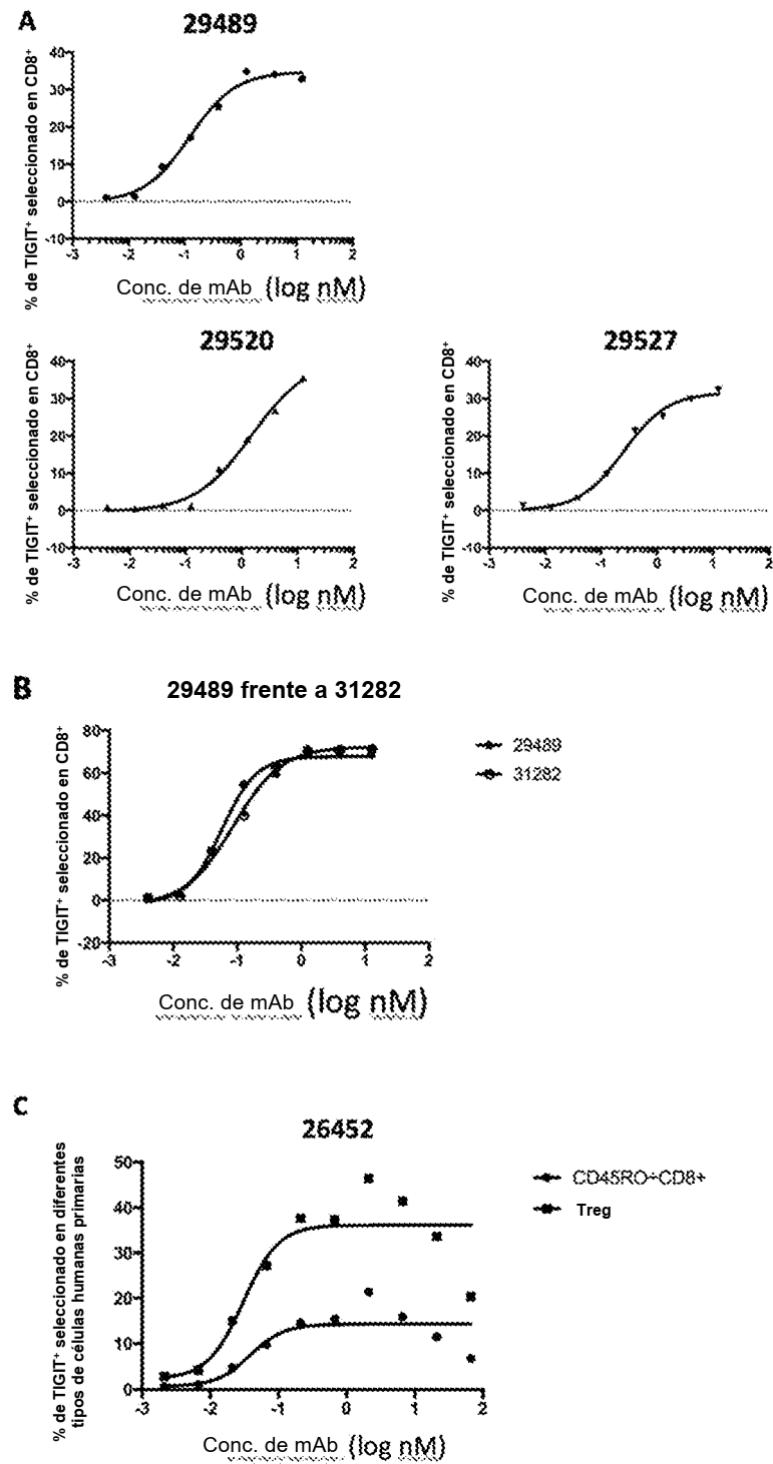
Figura 10 – Unión a linfocitos T CD8⁺ primarios humanos

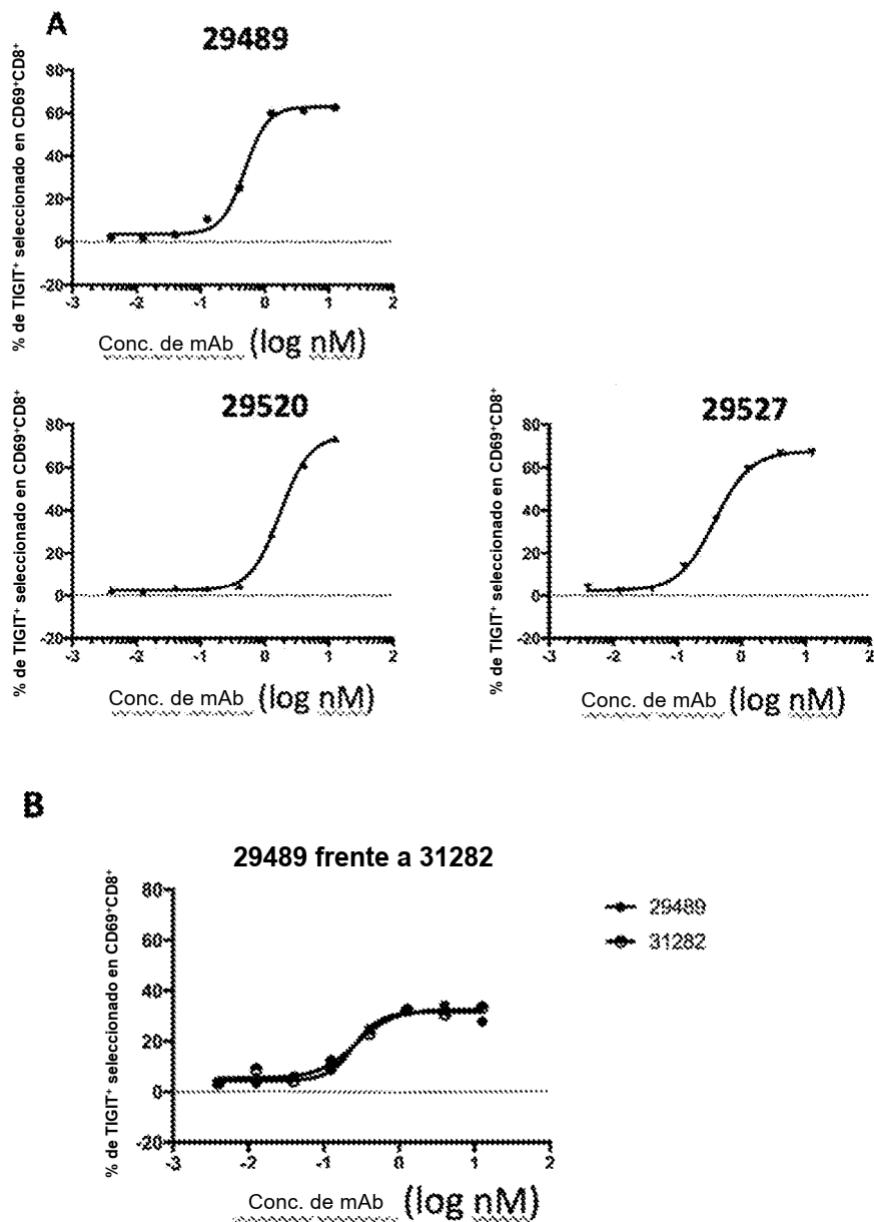
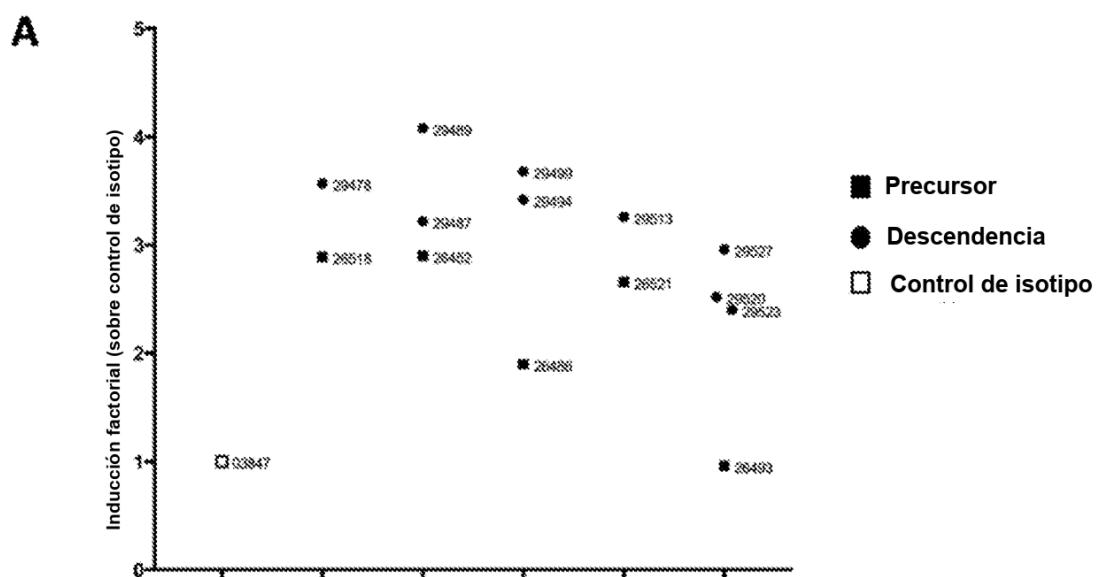
Figura 11 – Unión a linfocitos T CD8⁺ primarios de macaco

Figura 12 – Efecto de anticuerpos anti-TIGIT en un bioensayo de CHO-TCR-CD155 y Jurkat-hTIGIT



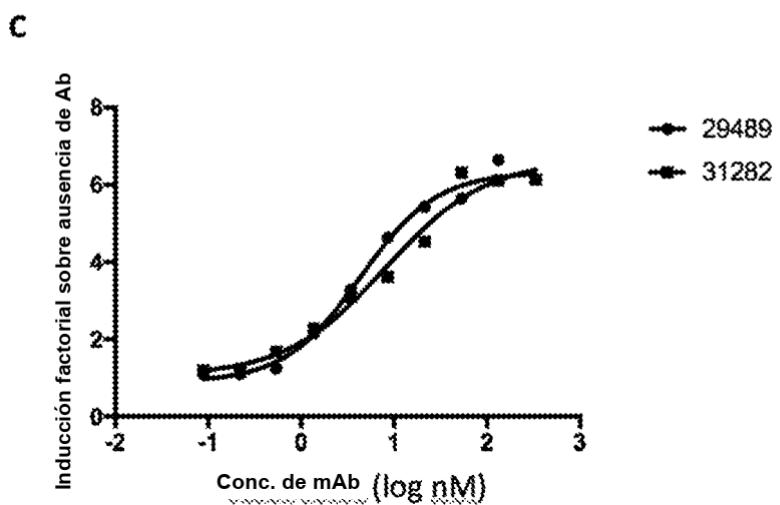
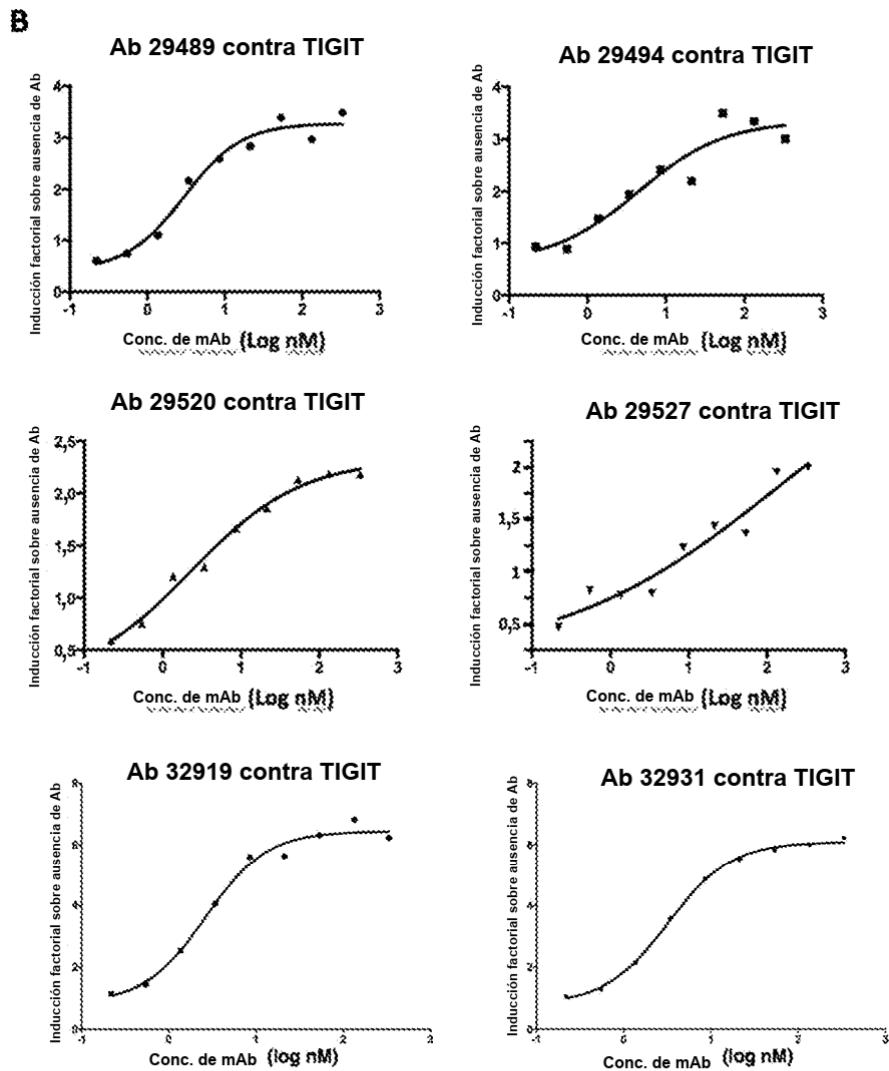


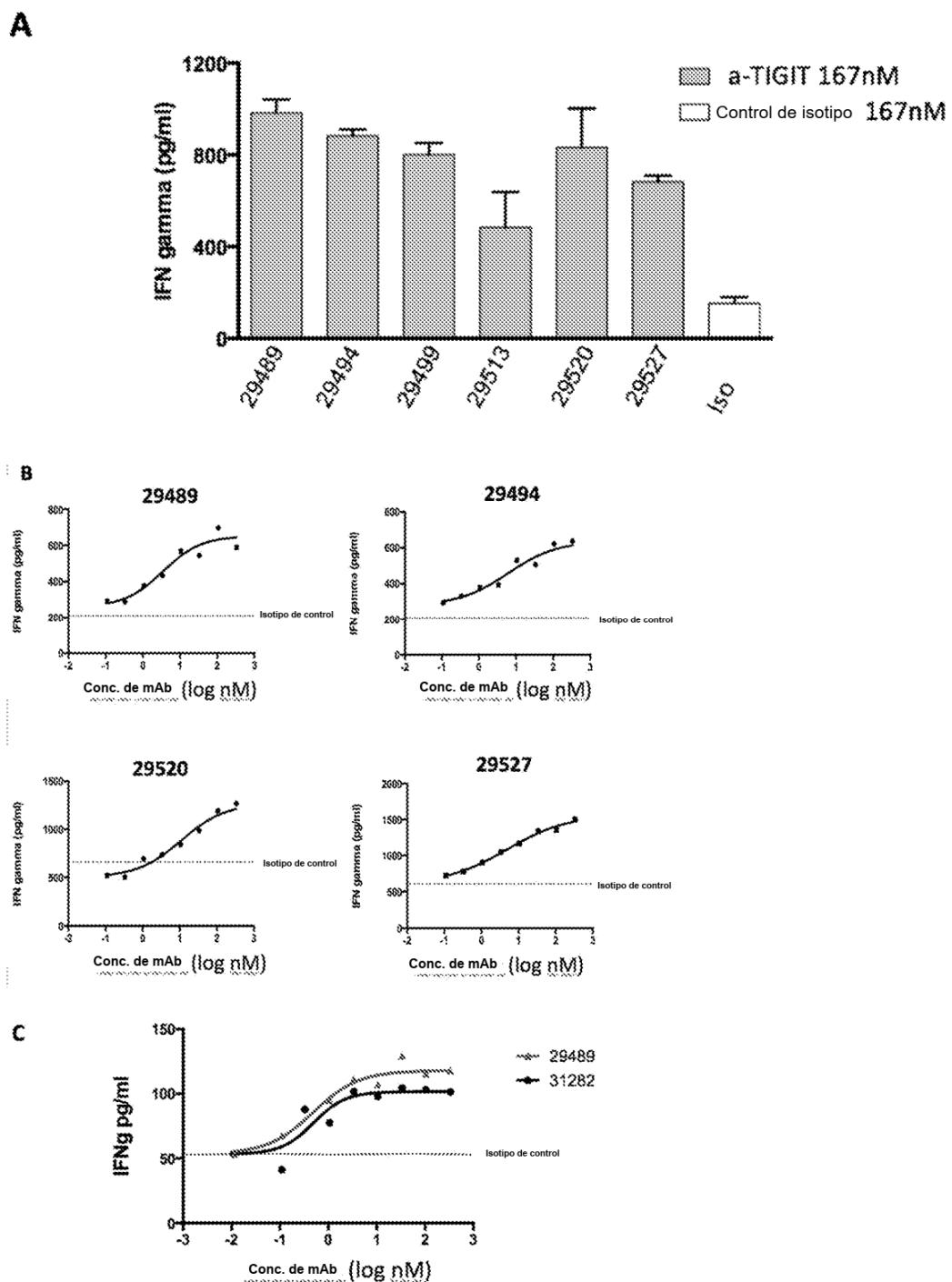
Figura 13 – Efecto de anticuerpos anti-TIGIT en ensayo funcional basado en linfocitos T CD8⁺ humanos

Figura 14 – Efecto de anticuerpos anti-TIGIT en ensayo funcional basado en TIL

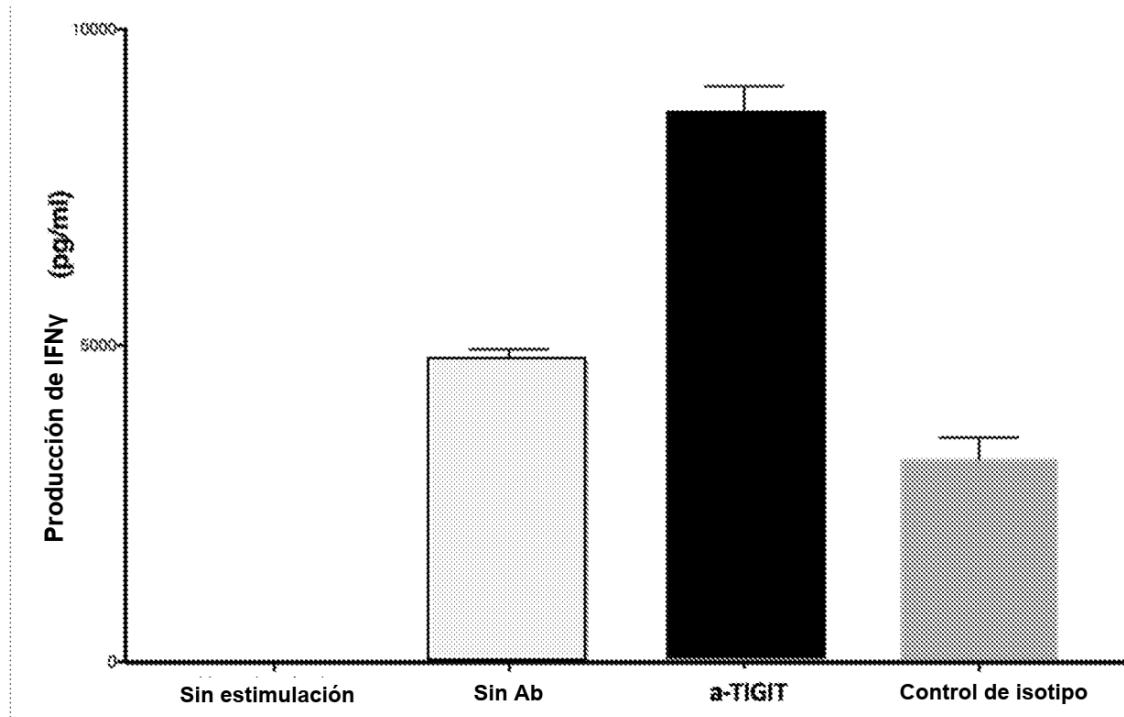


Figura 15 – Caracterización de anticuerpo equivalente de ratón anti-TIGIT que demuestra actividad funcional en ratón

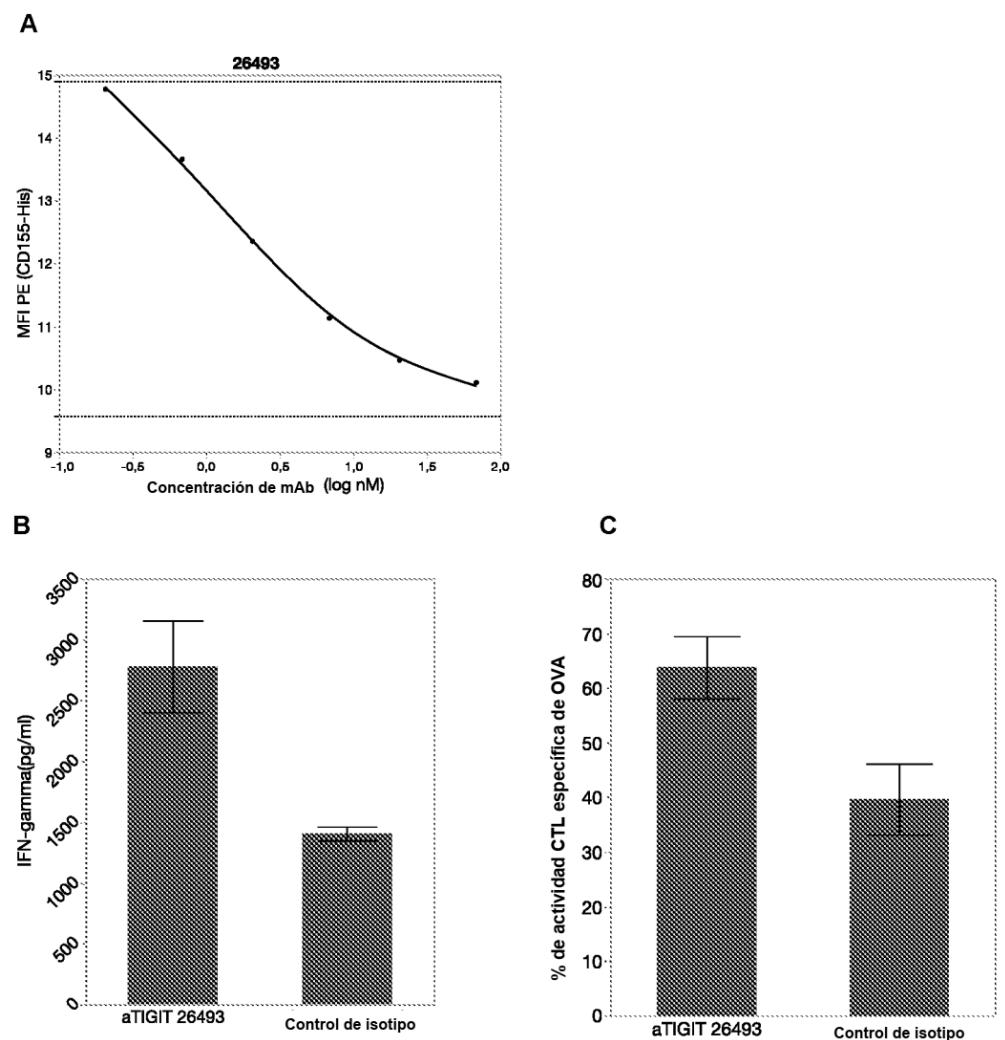


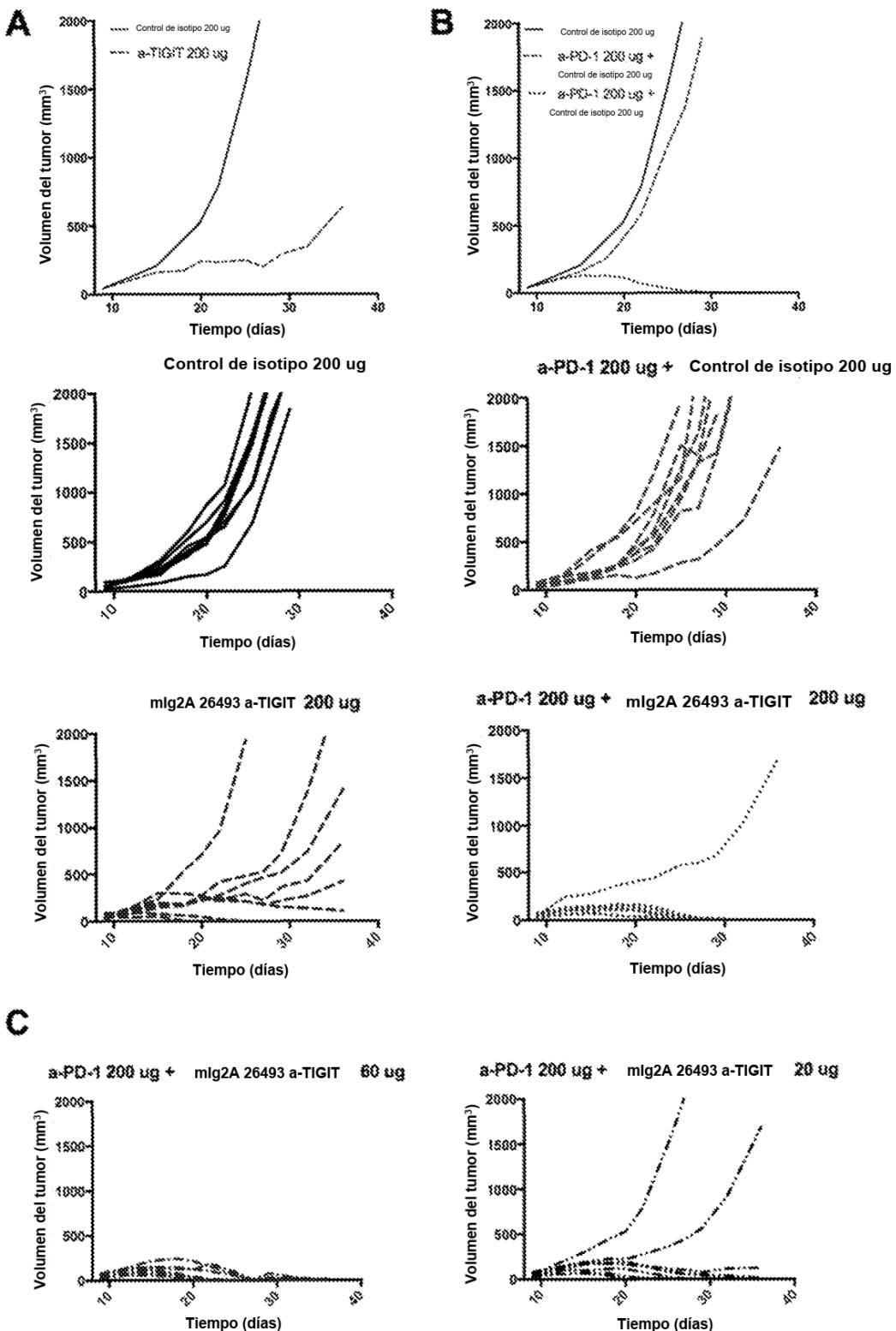
Figura 16 – Eficacia antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT

Figura 17 – Eficacia antitumoral dependiente de isotipo de anticuerpo antagonista anti-TIGIT

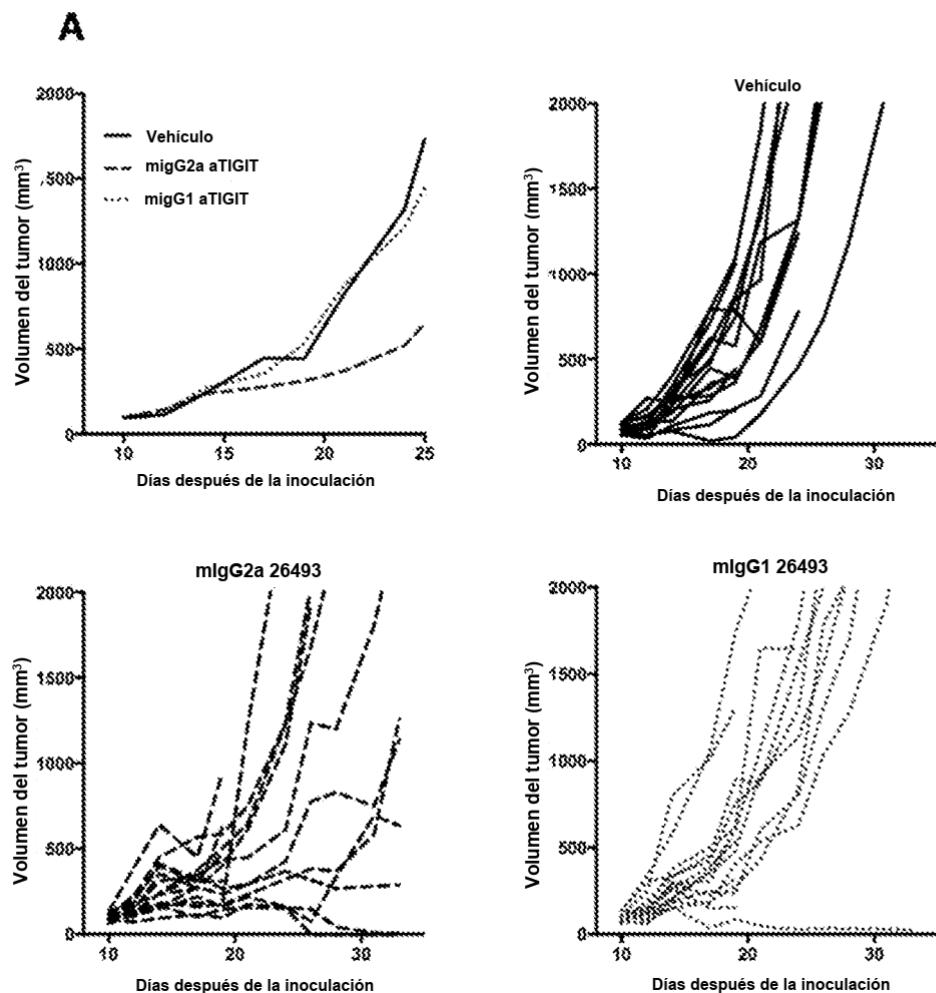


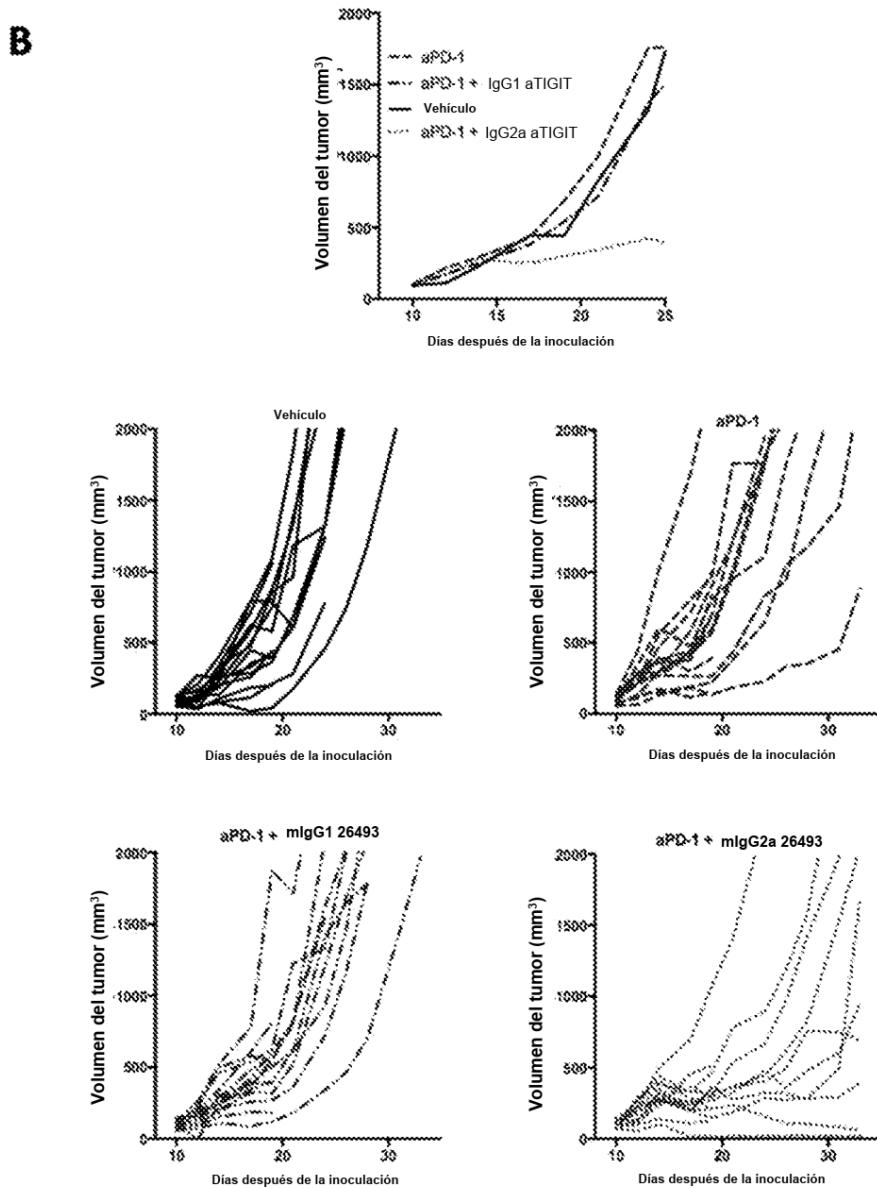
Figura 17 – Eficacia antitumoral dependiente de isotipo de anticuerpo antagonista anti-TIGIT

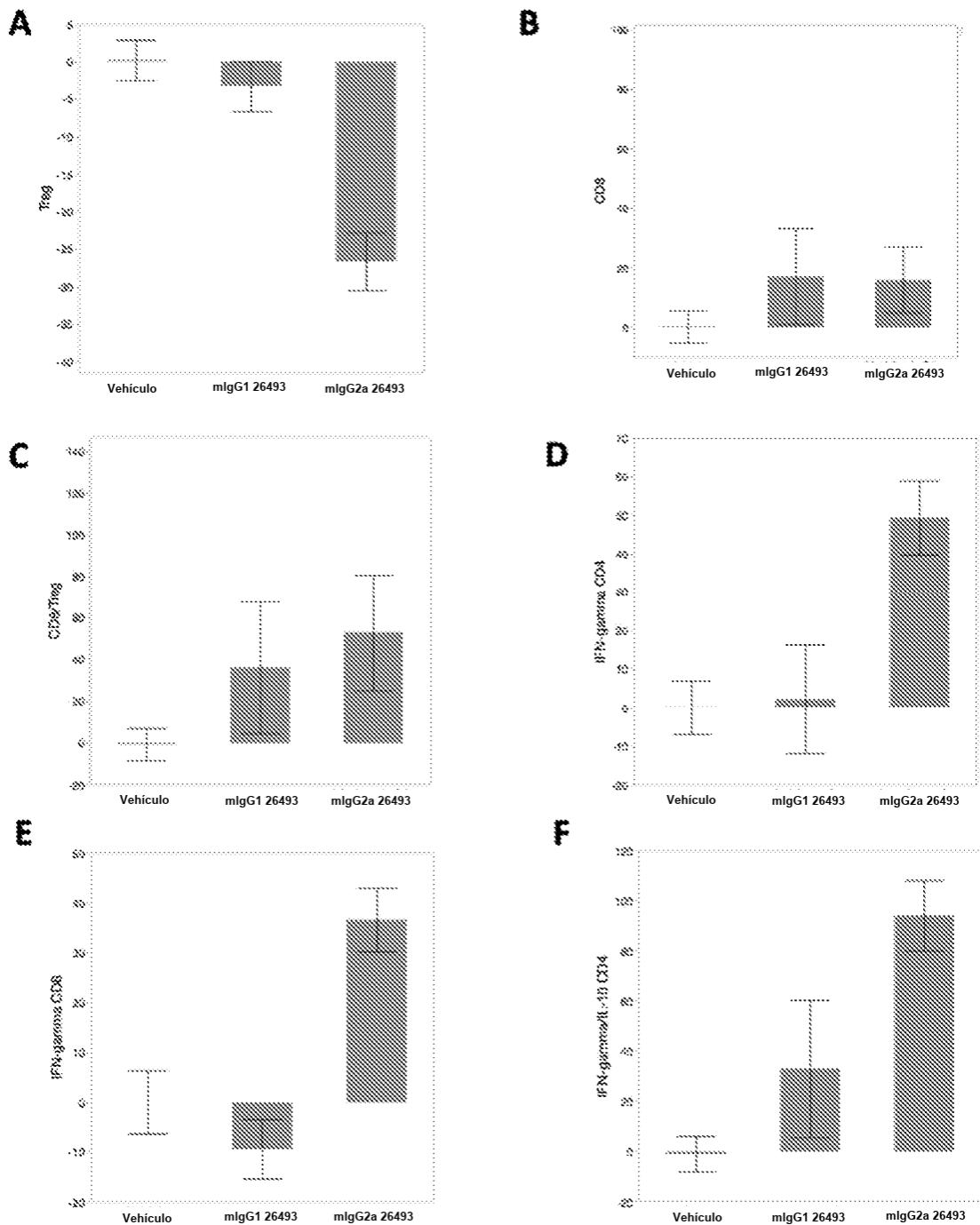
Figura 18 – Mecanismo de eficacia antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT

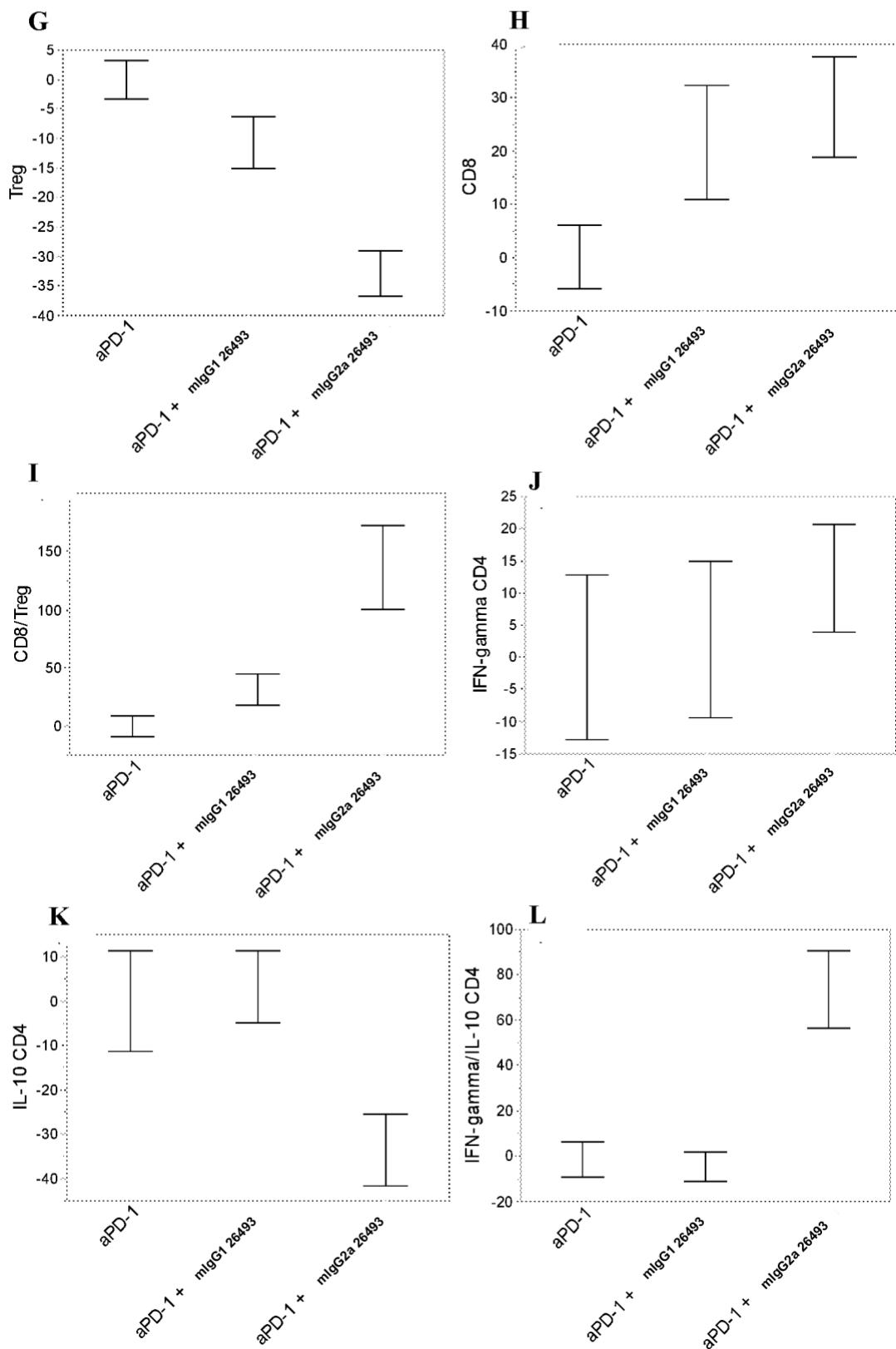
Figura 18 – Mecanismo de eficacia antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT

Figura 19 – Mecanismo de eficacia antitumoral de anticuerpo antagonista anti-TIGIT (análisis transcripcional)

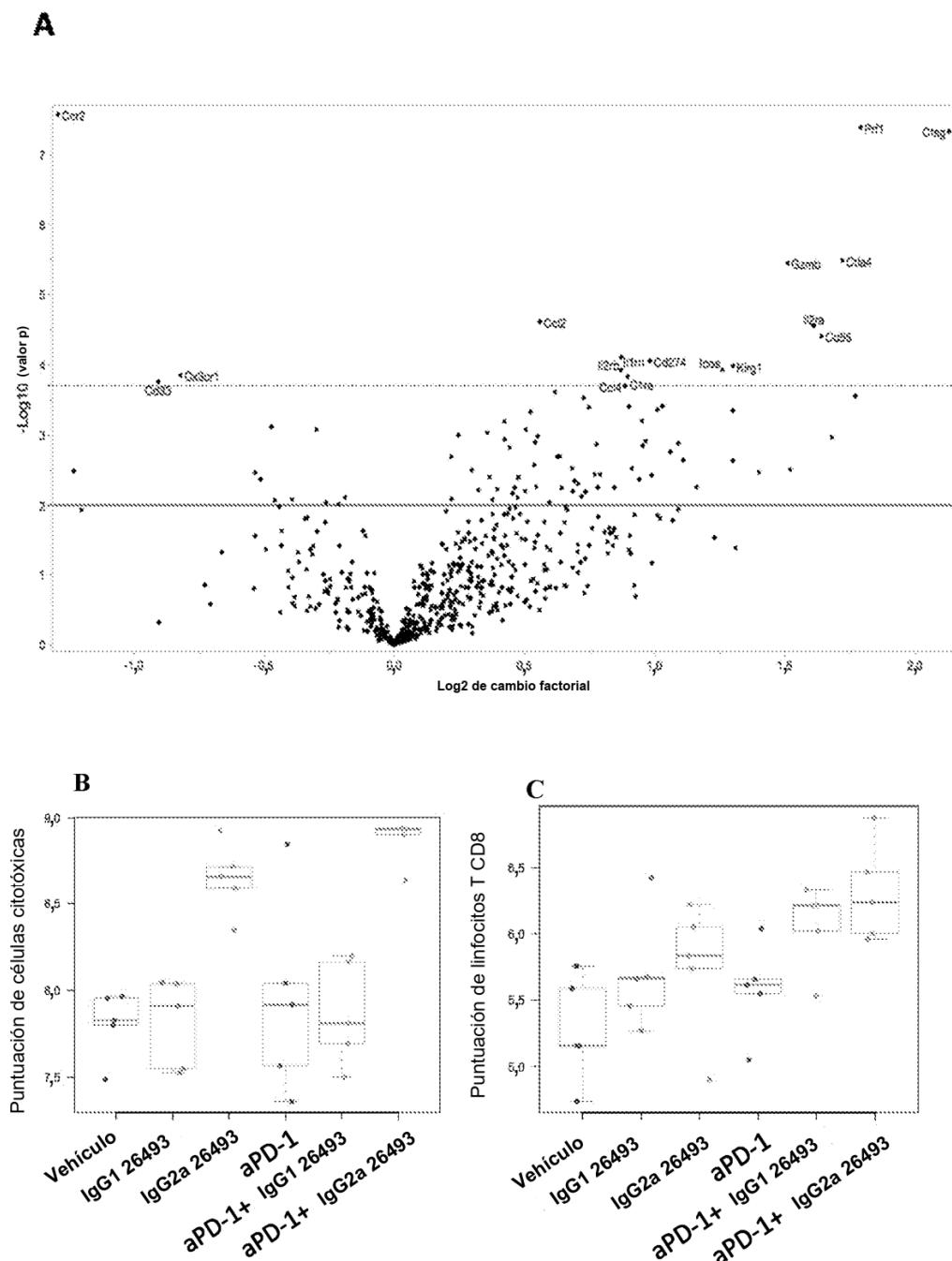


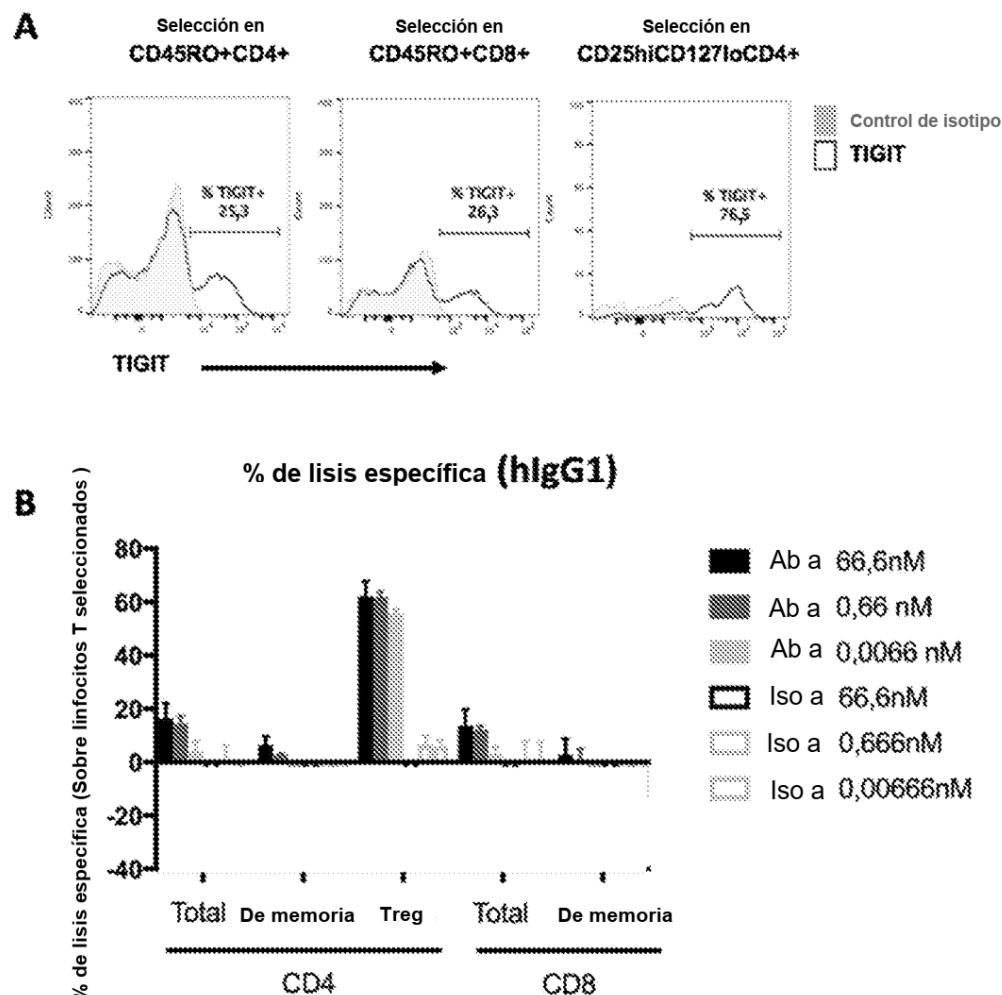
Figura 20 – Actividad ADCC sobre PBMC humanos sanos

Figura 21 – Reducción preferente de linfocitos Treg en suspensión de tumor de ratón

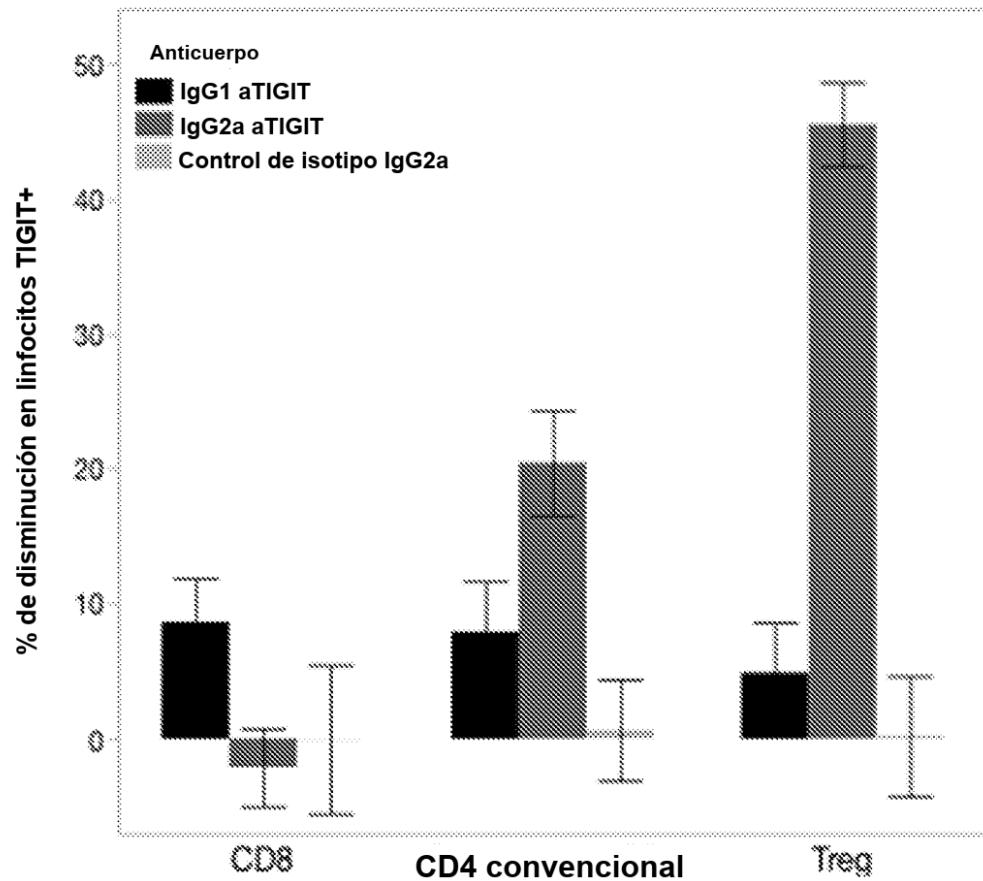


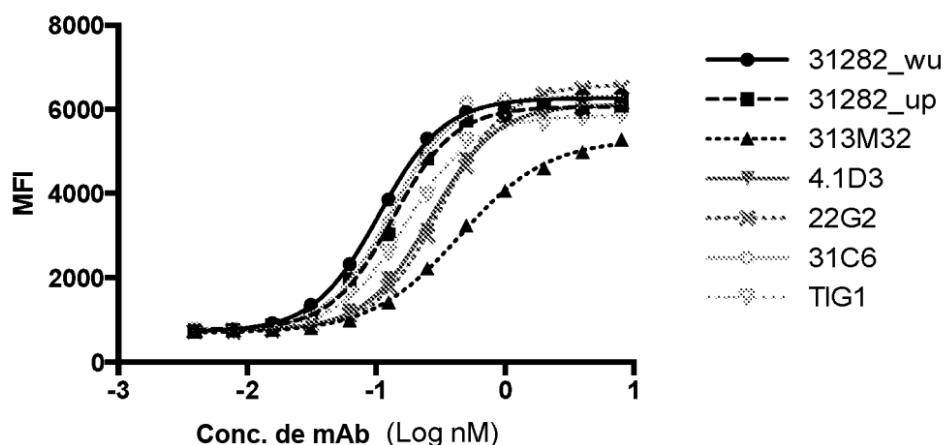
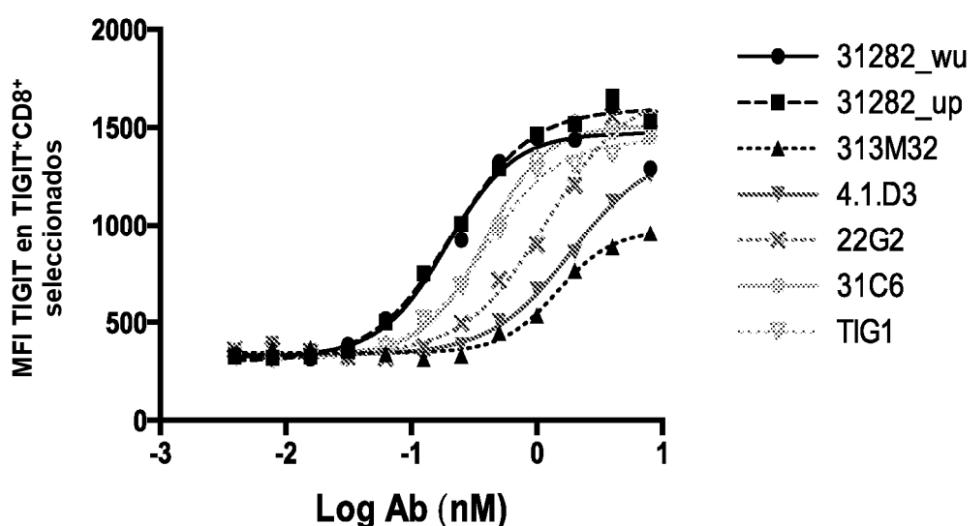
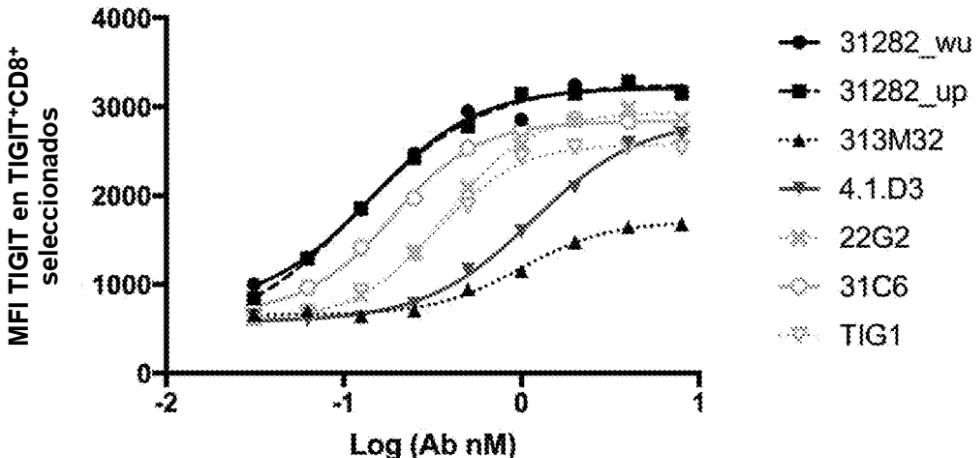
Figura 22**A****B****C**

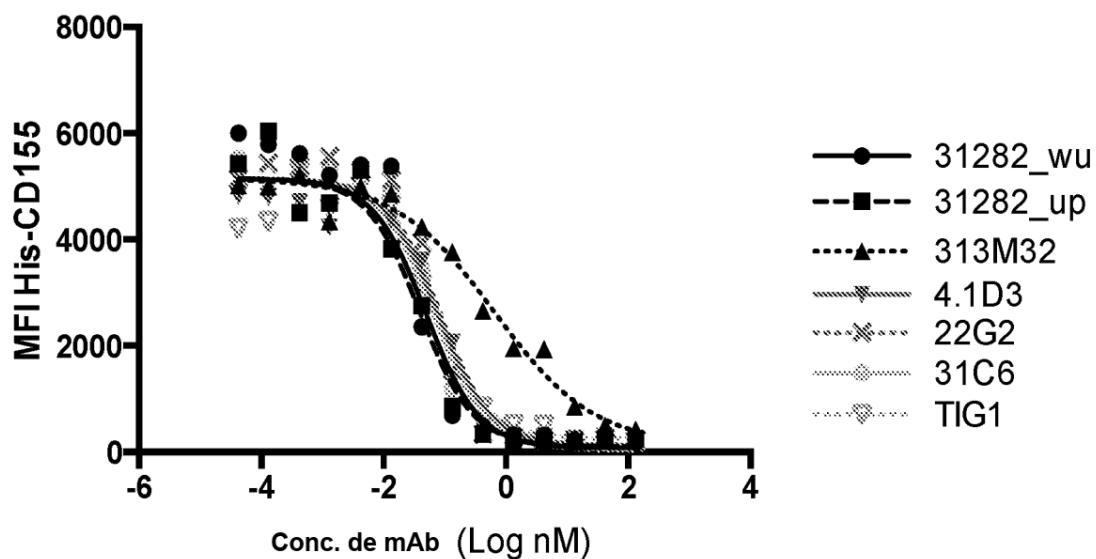
Figura 23

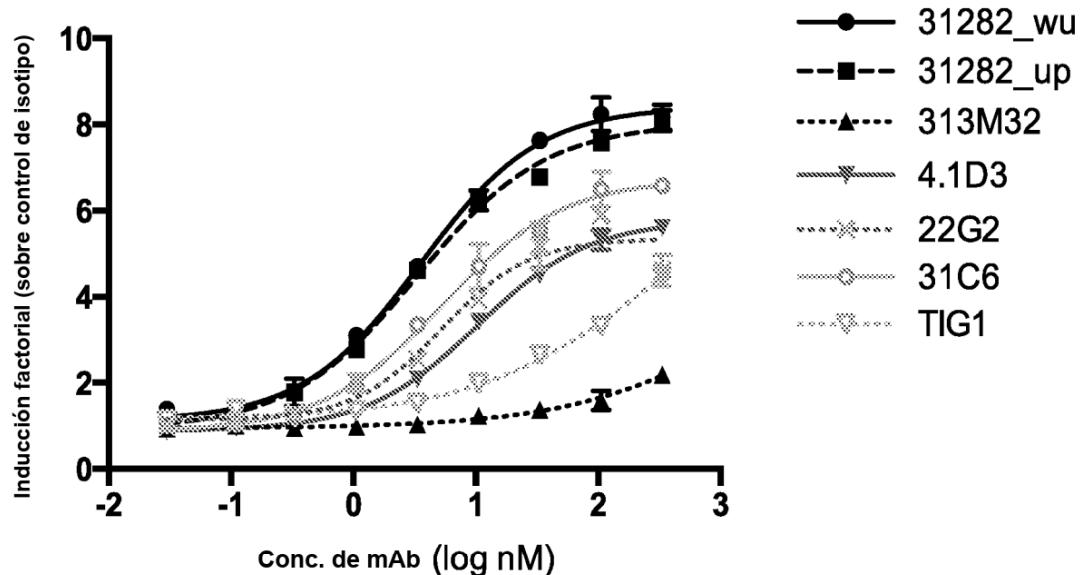
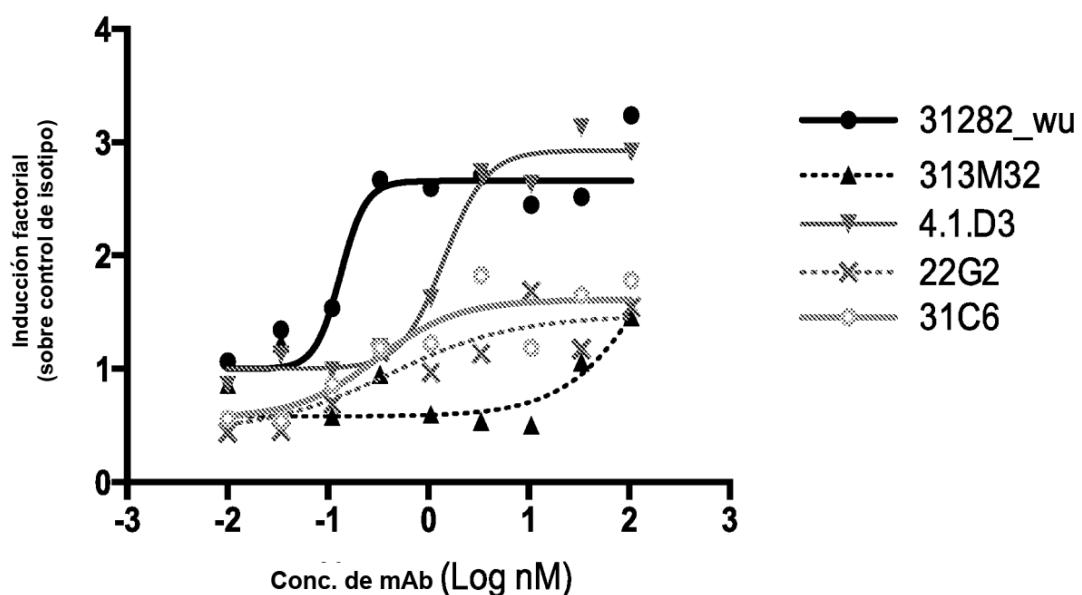
Figura 24**A****B**

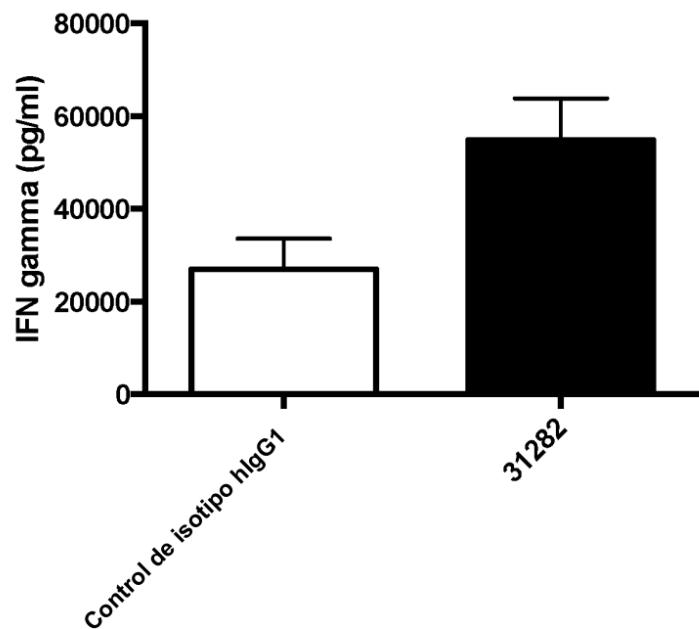
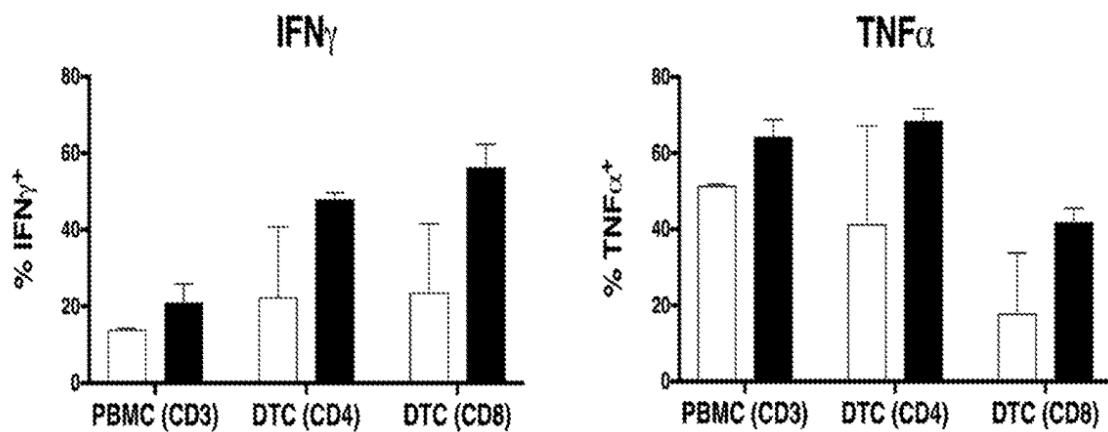
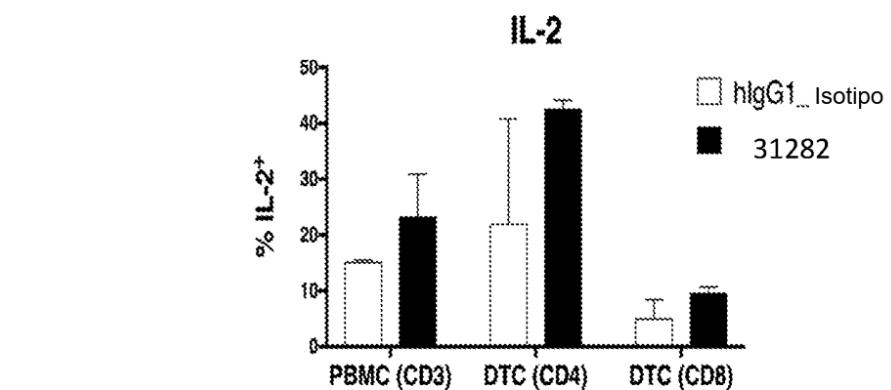
Figura 24 (Continuación)**C****D**

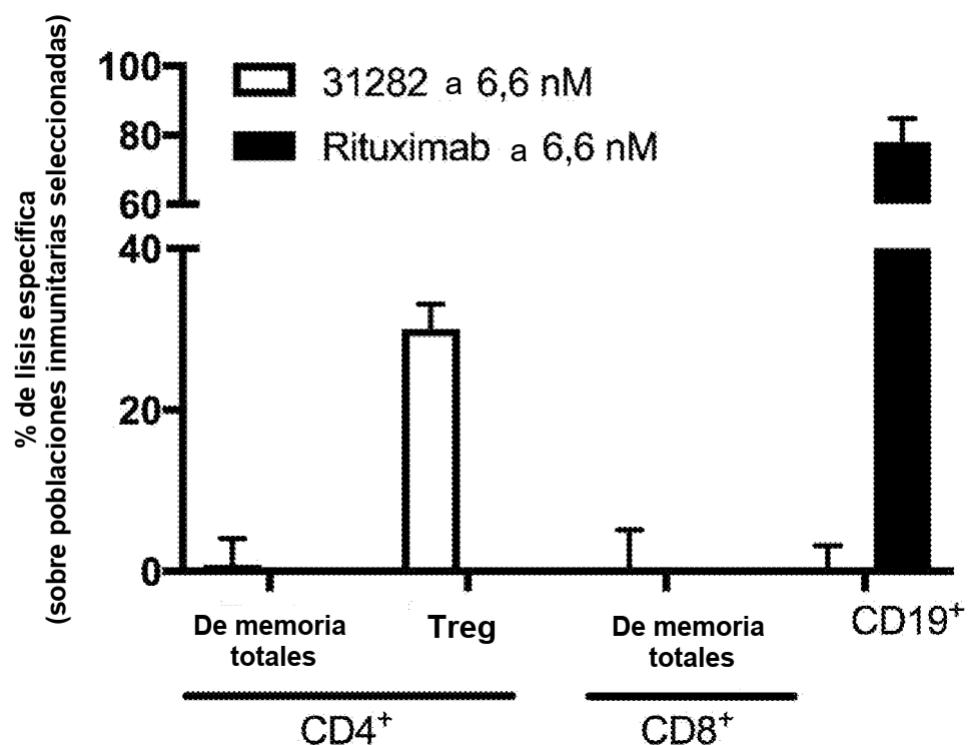
Figura 25

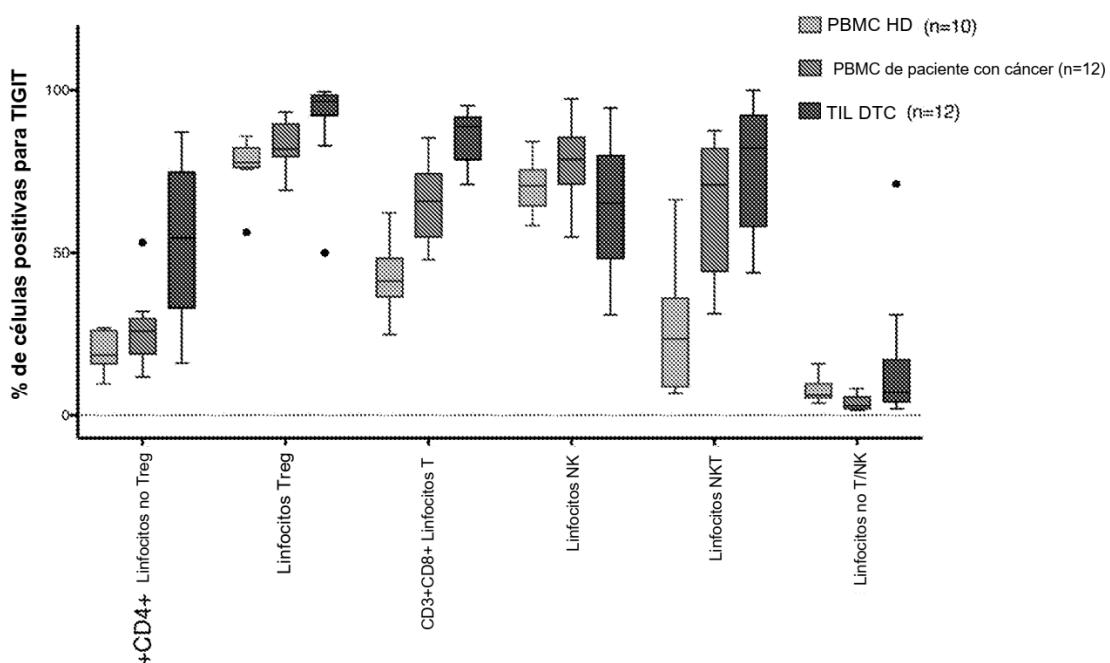
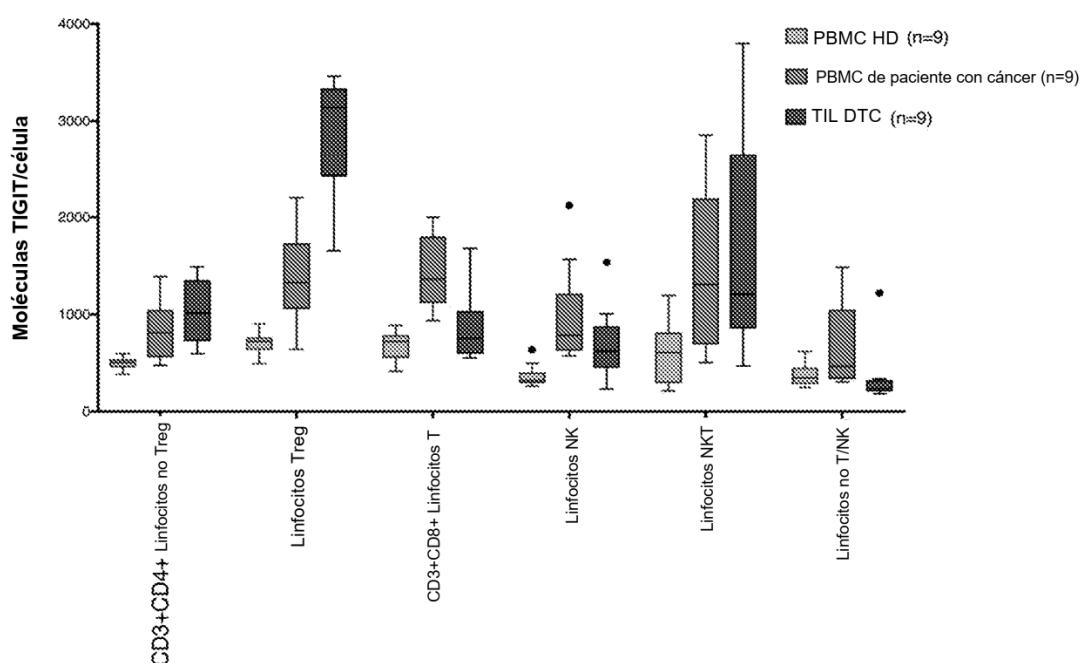
Figura 26**A****B**

Figura 27

A

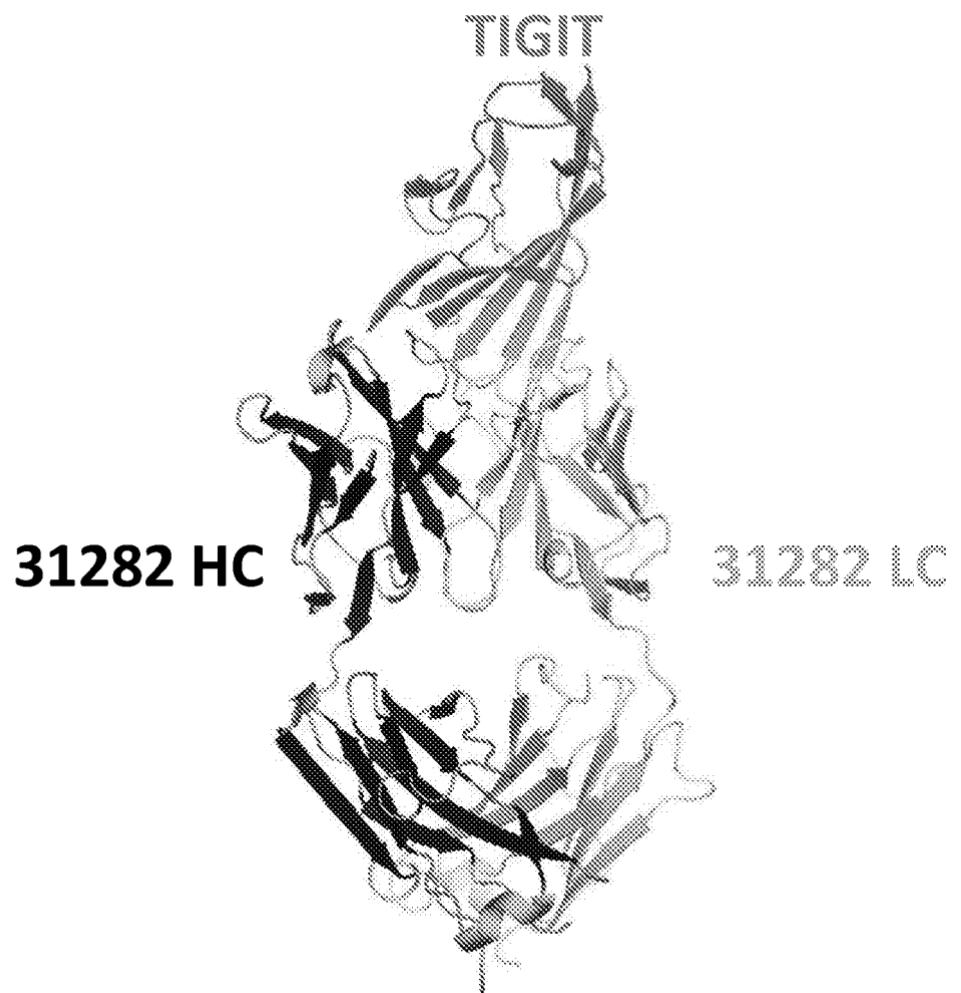


Figura 27

B

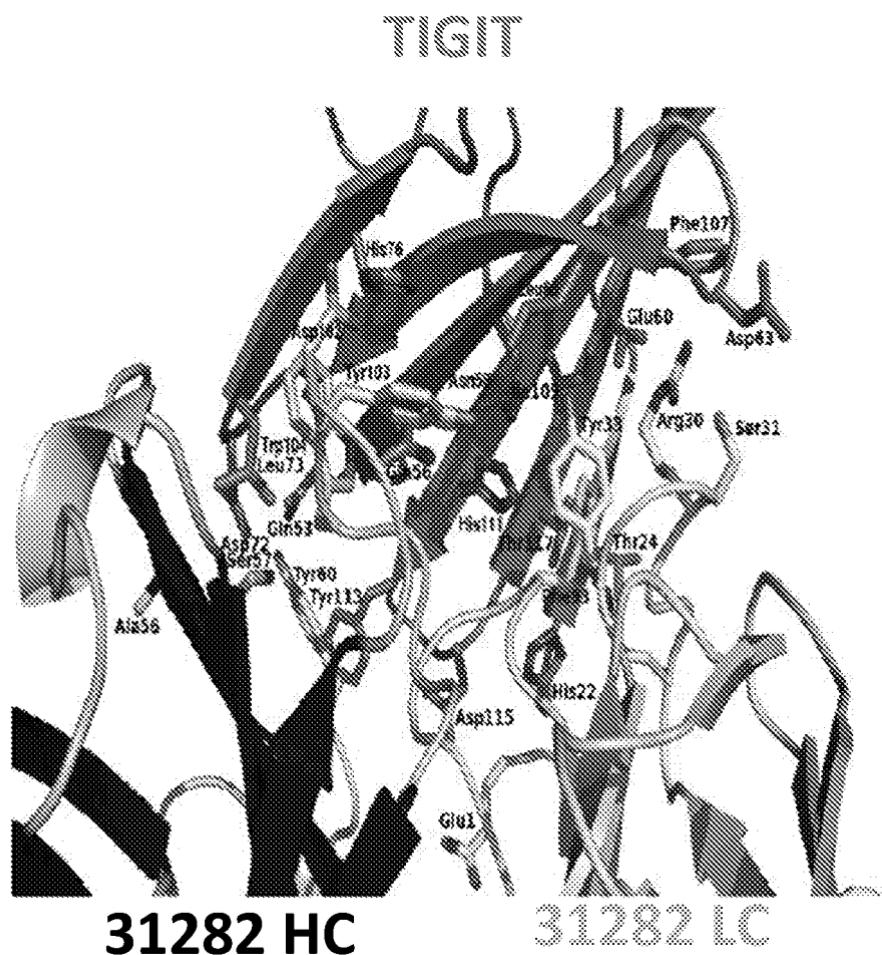


Figura 27C

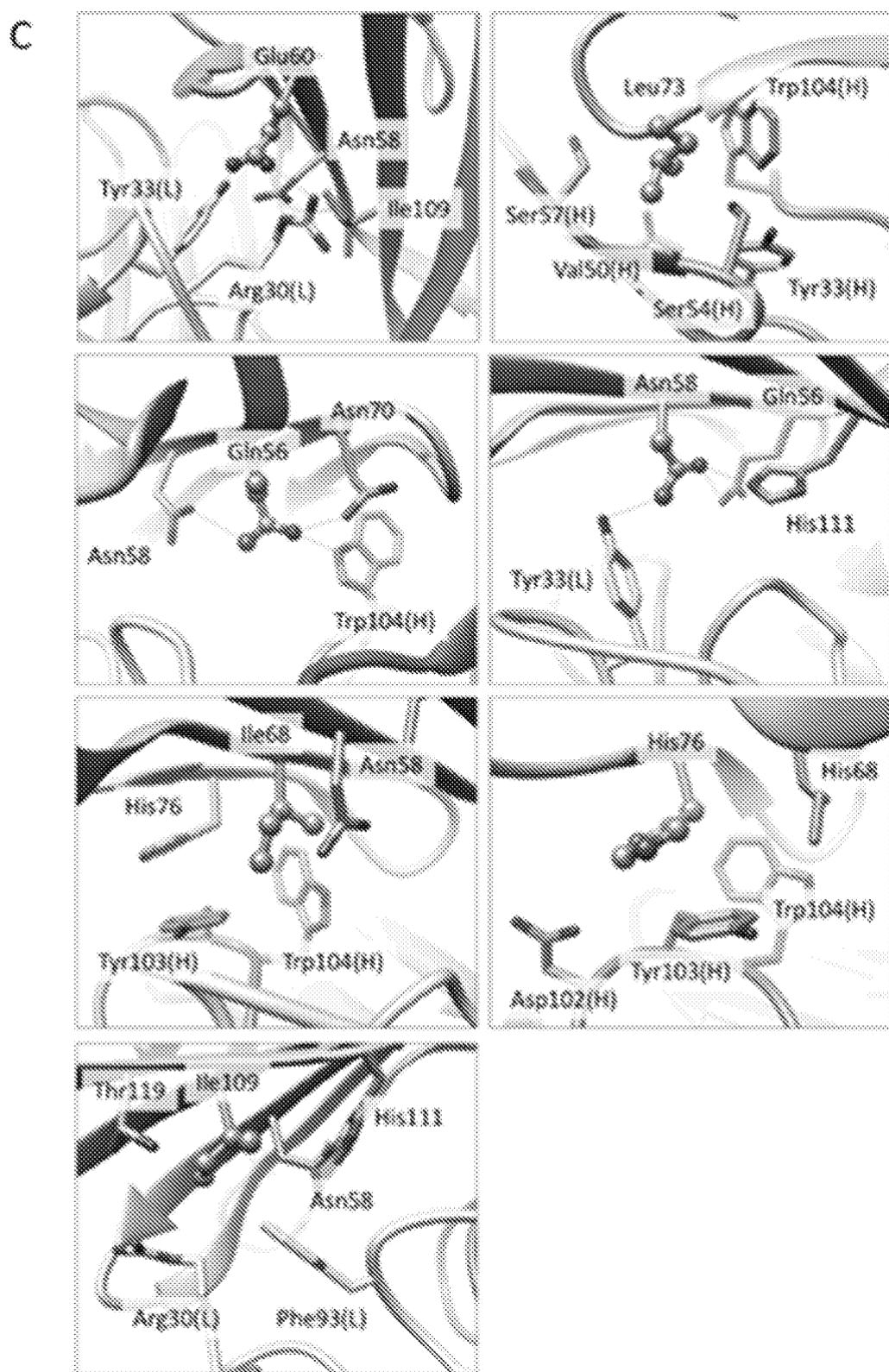


Figura 28

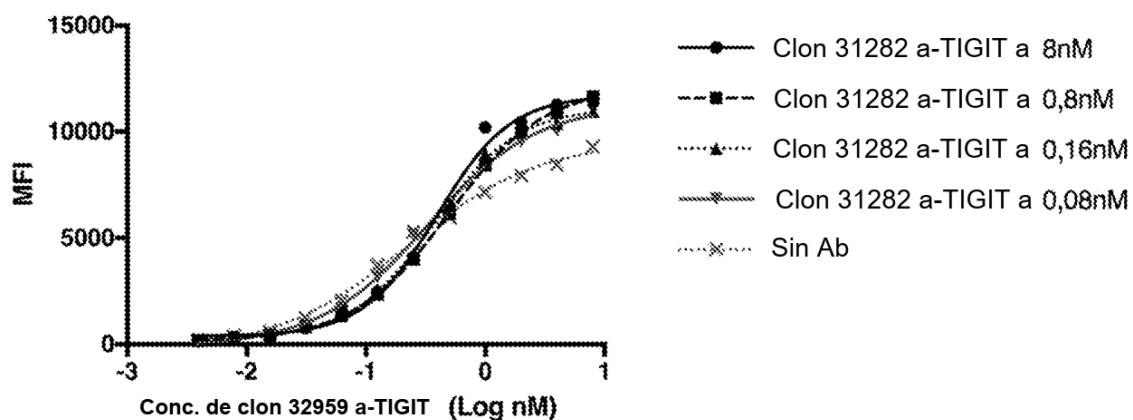


Figura 29

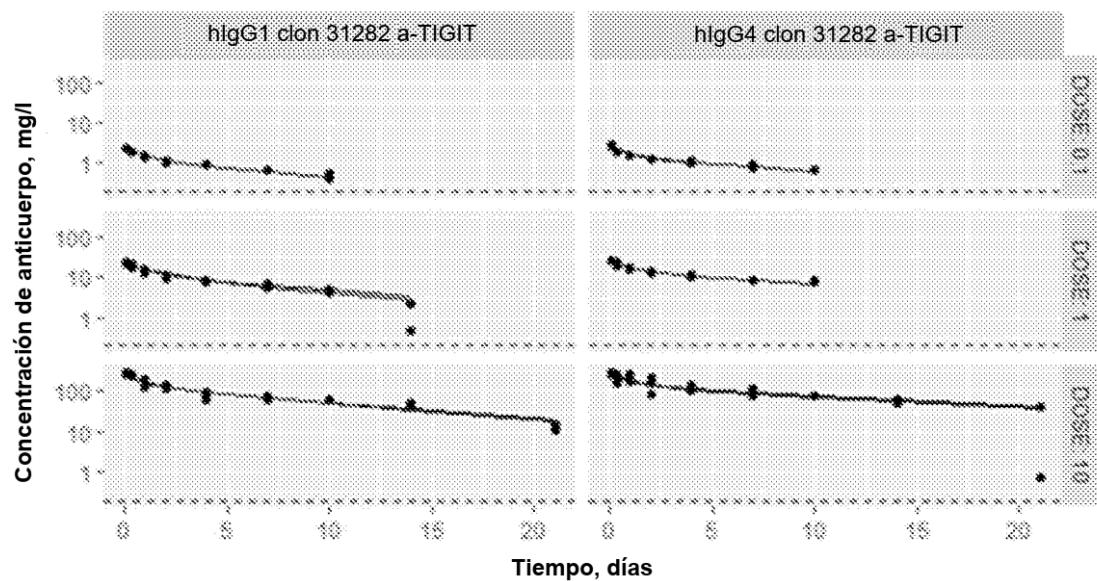
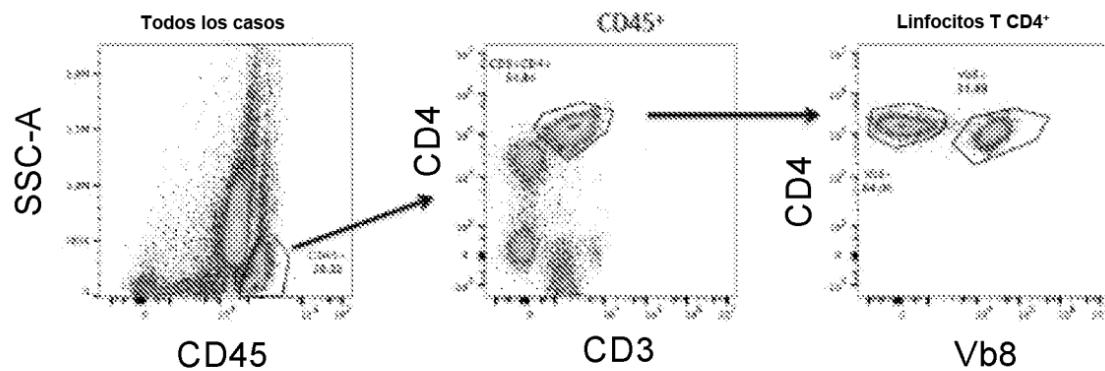


Figura 30

A



B

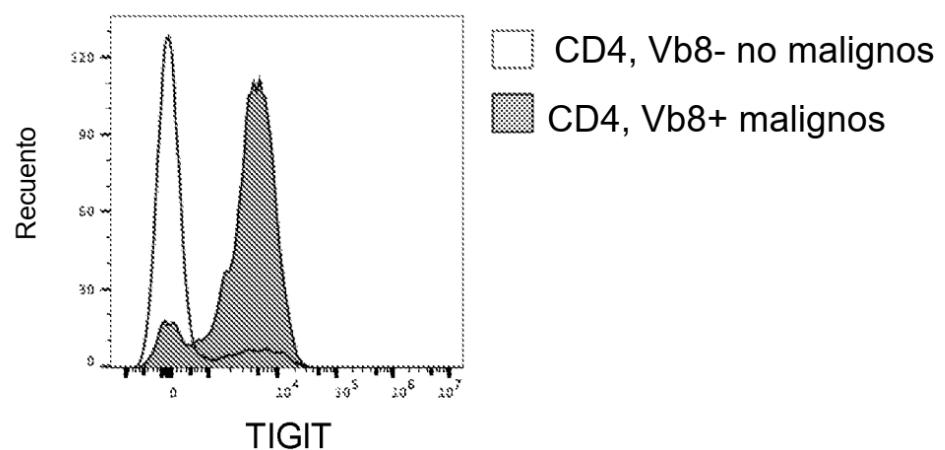


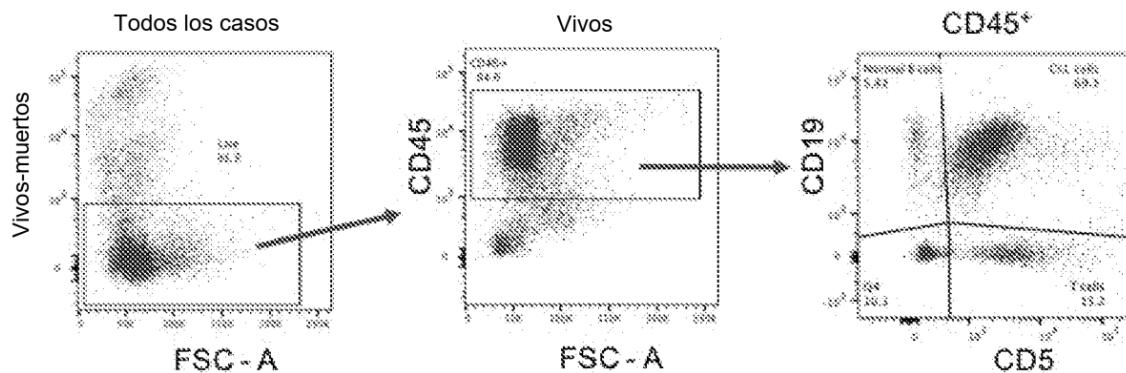
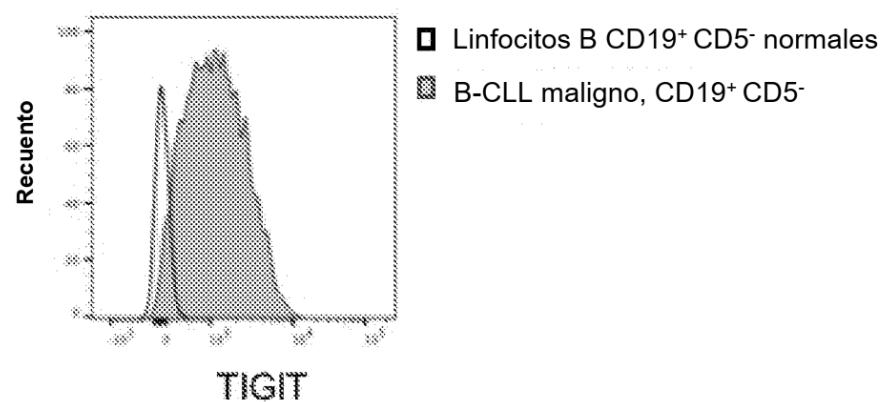
Figura 31**A****B**

Figura 32

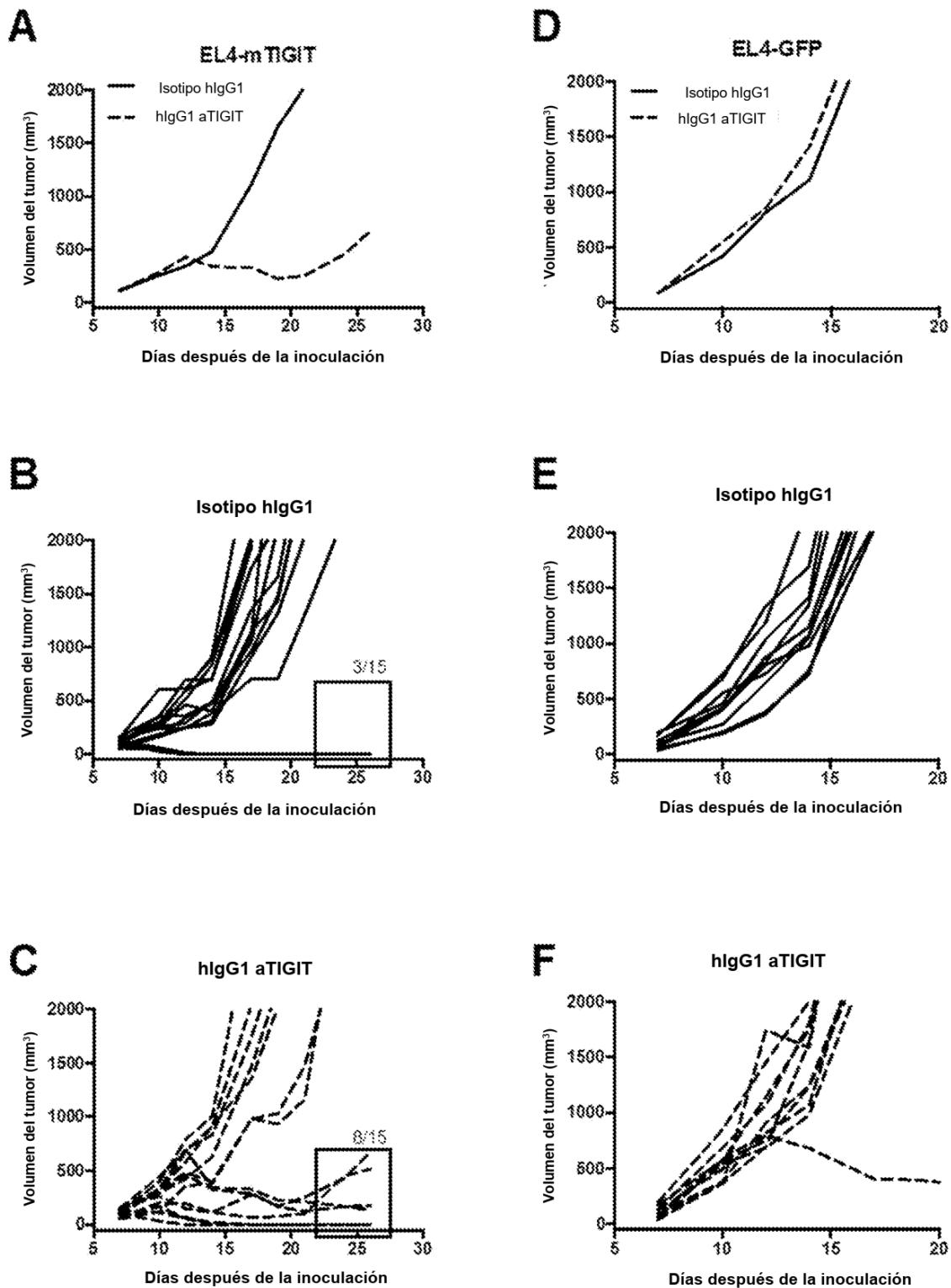


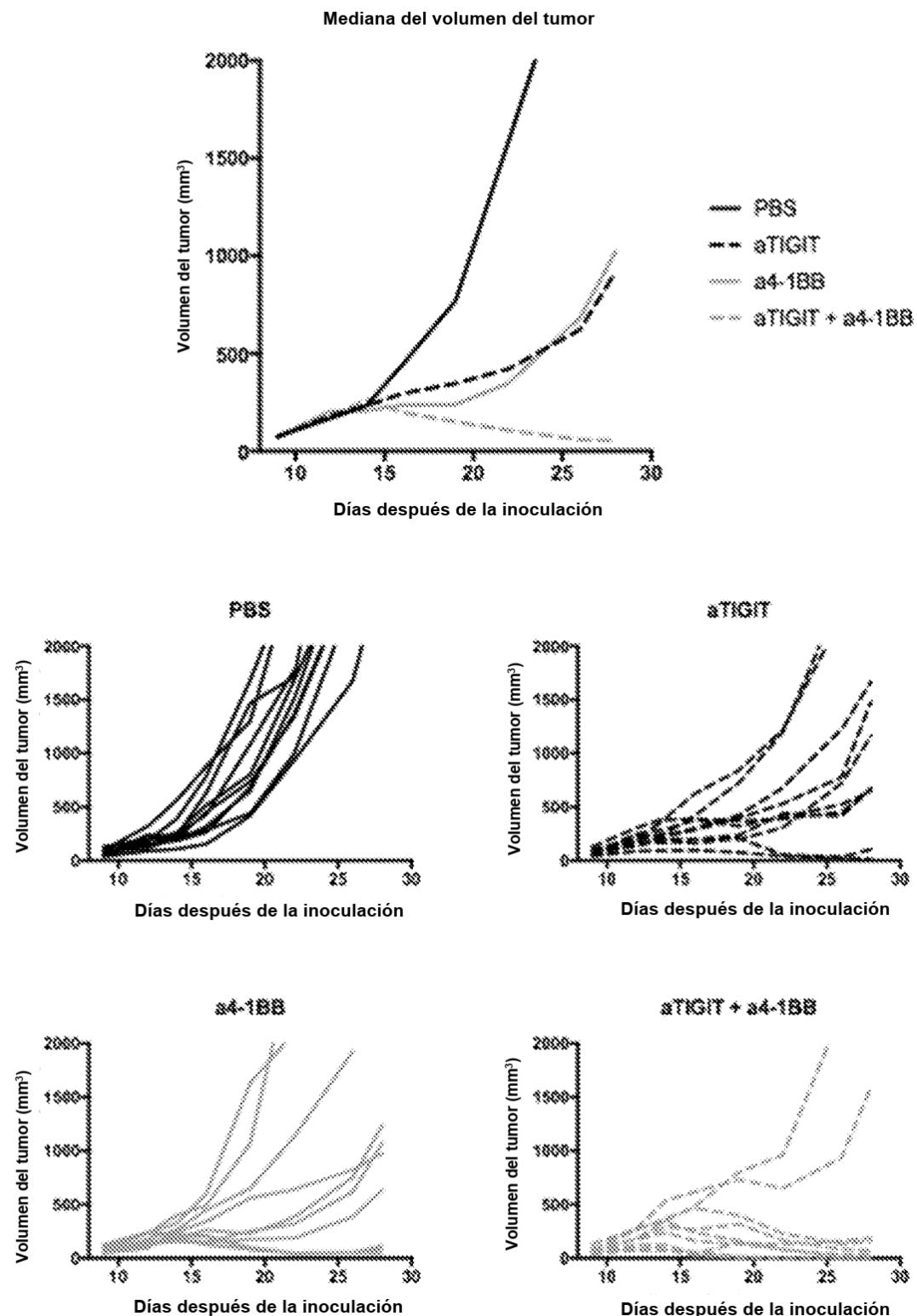
Figura 33**A**

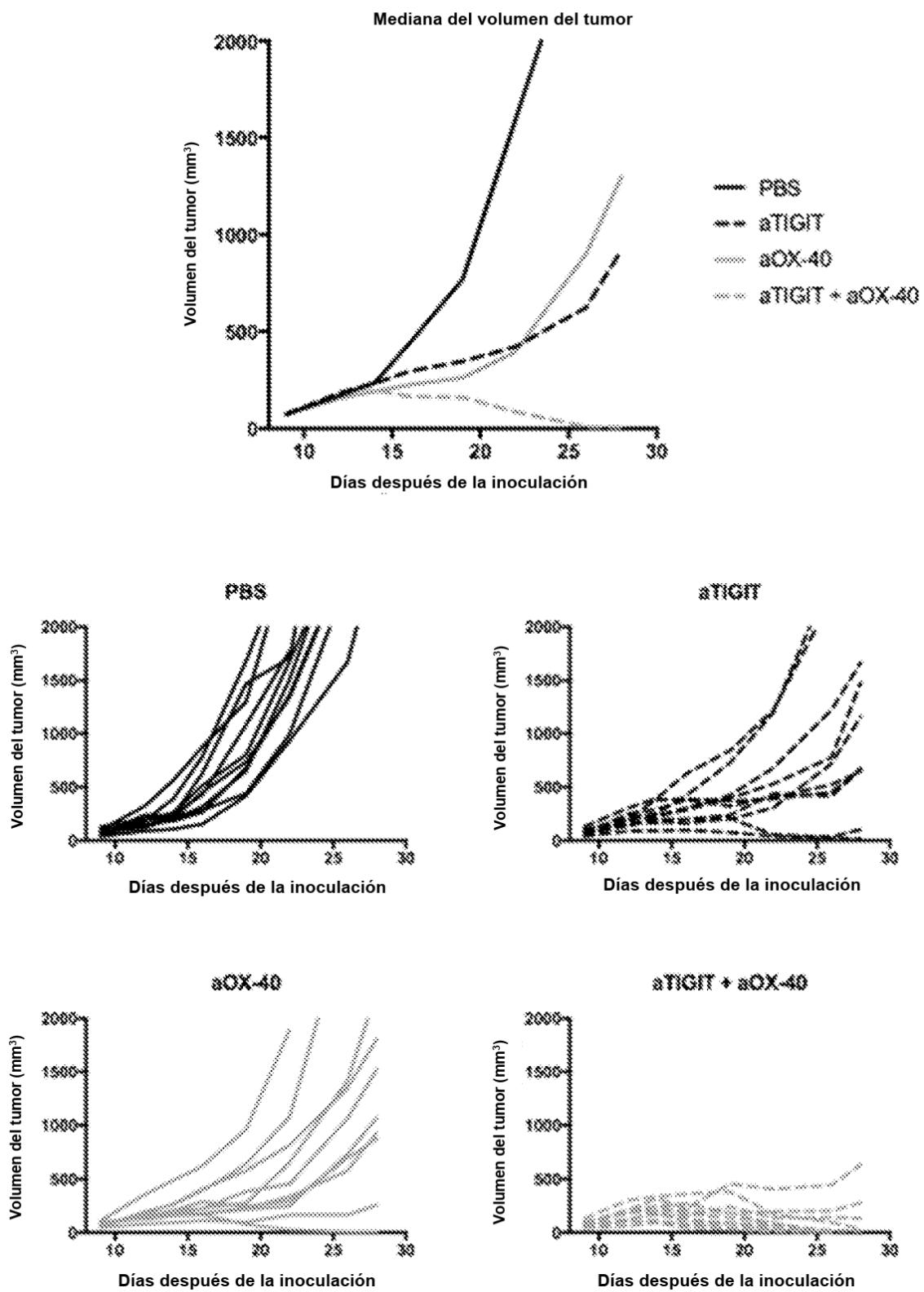
Figura 33**B**

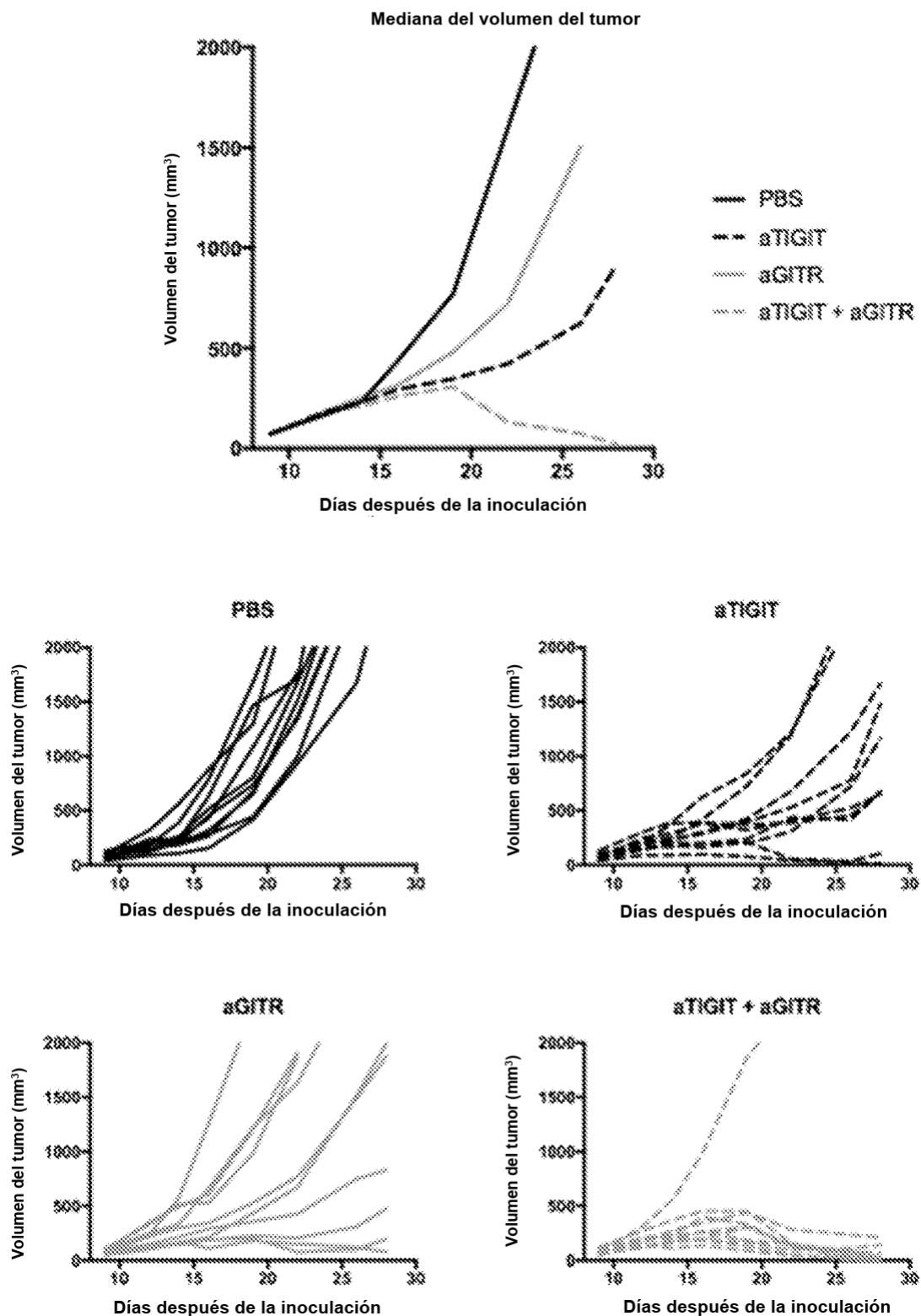
Figura 33**C**

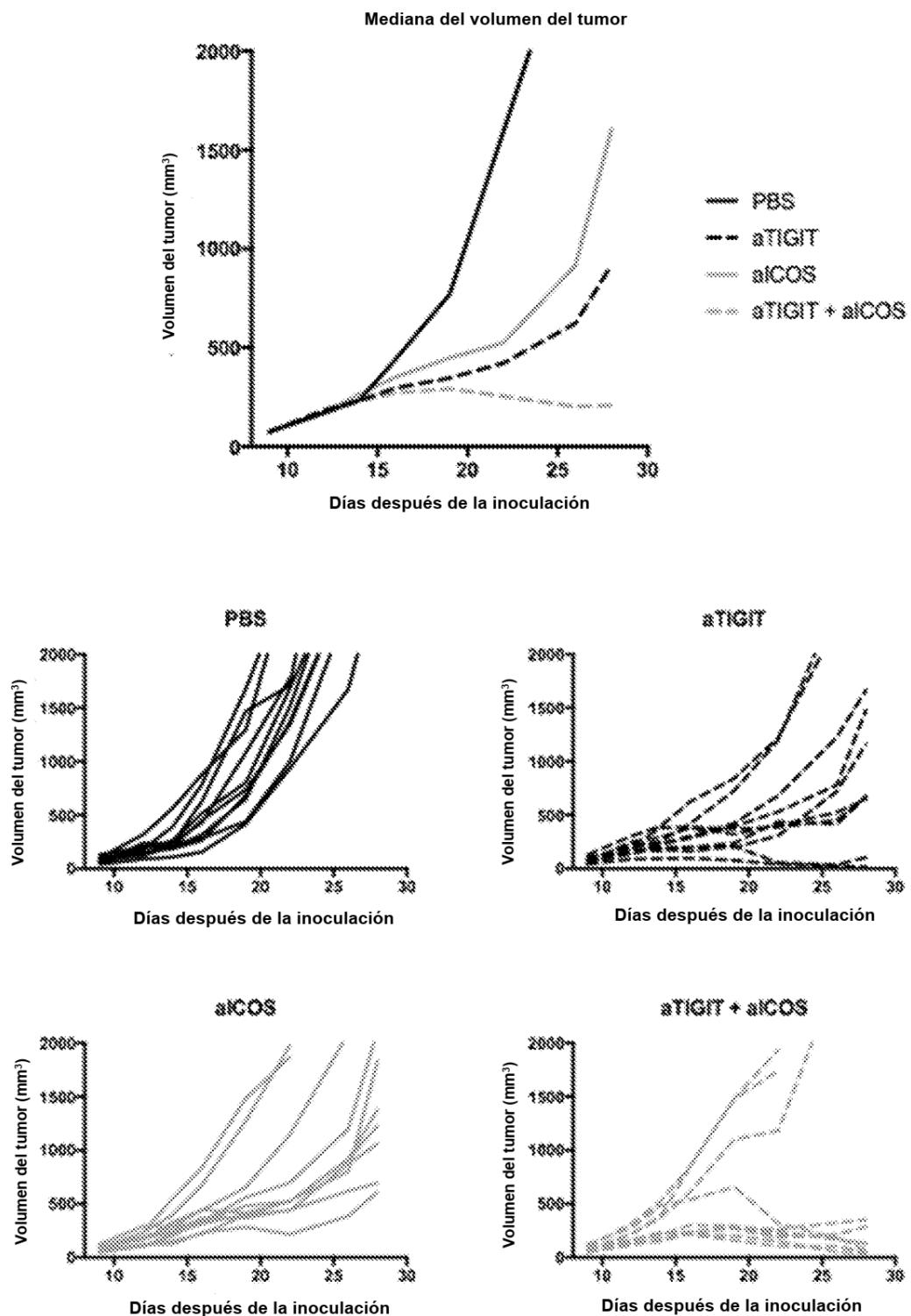
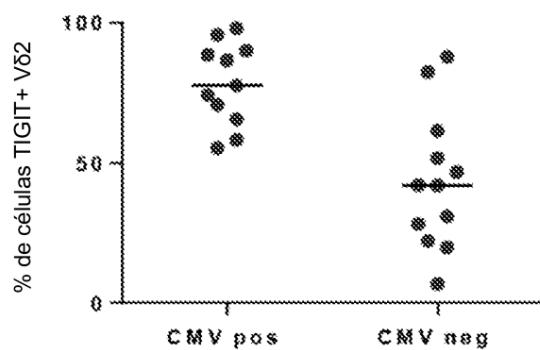
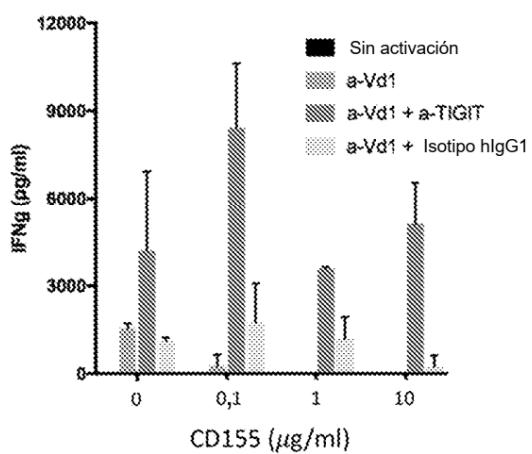
Figura 33**D**

Figura 34**A****B****C**