República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021003156-1 A2

(22) Data do Depósito: 22/08/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 11/05/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO, ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO E DE ANTICORPOS AFUCOSILADOS QUE SE LIGAM A TIGIT E PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, E, KIT.

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 20/09/2018 US 62/734,130; 22/03/2019 US 62/822,674; 23/08/2018 US 62/722,063.

(71) Depositante(es): SEAGEN, INC..

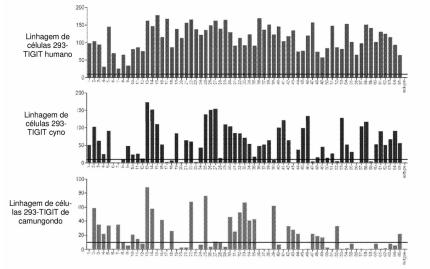
(72) Inventor(es): JULIA C. PIASECKI; COURTNEY BEERS; SCOTT PETERSON; BIANKA PRINZ; SHYRA GARDAI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019047607 de 22/08/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/041541 de 27/02/2020

(85) Data da Fase Nacional: 19/02/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO E DE ANTICORPOS AFUCOSILADOS QUE SE LIGAM A TIGIT E PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, E, KIT. A presente invenção provê anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM). Em algumas modalidades, o anticorpo tem uma afinidade de ligação (KD) por TIGIT humano inferior a 5 nM. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT bloqueia a ligação de CD155 e/ou CD112 a TIGIT. Em algumas modalidades, os anticorpos são afucosilados.



COMPOSIÇÃO, ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO E DE ANTICORPOS AFUCOSILADOS QUE SE LIGAM A TIGIT E PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, E, KIT

Referência cruzada a pedidos de patente correlatos

[001] Este pedido de patente reivindica o benefício de prioridade deste ao Pedido de Patente dos E.U.A. Provisório Nº 62/722 063, depositado em 23 de agosto de 2018; ao Pedido de Patente dos E.U.A. Provisório Nº 62/734 130, depositado em 20 de setembro de 2018; e ao Pedido de Patente dos E.U.A. Provisório Nº 62/822 674, depositado em 22 de março de 2019; cujos conteúdos são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência para qualquer efeito.

Campo da invenção

[002] A presente invenção provê anticorpos que se ligam a TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM) e usos dos mesmos.

Fundamentos da invenção

[003] TIGIT (“Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM”) é um receptor imune expresso em subconjuntos de células T, tais como células T ativadas, de memória e reguladoras e células *natural killer* (NK). TIGIT faz parte da família CD28 dentro da superfamília Ig de proteínas e serve como uma molécula coinibidora que limita a proliferação e ativação de células T e a função das células NK. TIGIT medeia seu efeito imunossupressor ao competir com CD226 (também conhecido como Molécula-1 Acessória DNAX ou “DNAM-1”) pelo mesmo conjunto de ligantes: CD155 (também conhecido como receptor do poliovírus ou “PVR”) e CD112 (também conhecido como relacionado 2 ao receptor do poliovírus

ou “PVRL2”). Ver, Levin *et al*., *Eur. J. Immunol*., 2011, 41:902-915. Dado que a afinidade de CD155 por TIGIT é maior do que a sua afinidade por CD226, na presença de TIGIT, a sinalização de CD226 é inibida, limitando, com isso, a proliferação e ativação de células T.

[004] Em pacientes com melanoma, a expressão de TIGIT é regulada positivamente em células T $CD8^+$ antígeno-tumoral (TA)-específicas e linfócitos $CD8^+$ infiltrantes de tumor (TILs). O bloqueio de TIGIT na presença de células que expressam o ligante (CD155) de TIGIT aumentou a proliferação, a produção de citocinas e a desgranulação de células T $CD8^+$ TA-específicas e TILs $CD8^+$. Ver, Chauvin *et al*., *J Clin Invest*., 2015, 125:2046-2058. Assim, TIGIT representa um alvo terapêutico potencial para estimulação de respostas antitumorais de células T em pacientes, embora ainda exista necessidade de métodos melhorados para o bloqueio de TIGIT e para a promoção de respostas antitumorais.

Breve sumário da invenção

[005] Modalidade 1. Uma composição compreendendo anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), em que os anticorpos têm uma afinidade de ligação (K_D) for TIGIT humano inferior a 5 nM e em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

[006] Modalidade 2. A composição da modalidade 1, em que os anticorpos têm uma K_D por TIGIT humano inferior a 1 nM.

[007] Modalidade 3. A composição da modalidade 1, em que os anticorpos têm uma K_D por TIGIT humano inferior a 100 pM.

[008] Modalidade 4. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 3, em que os anticorpos exibem reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

[009] Modalidade 5. A composição da modalidade 4, em que os anticorpos exibem reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

[0010] Modalidade 6. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 5, em que os anticorpos bloqueiam a ligação de CD155 a TIGIT.

[0011] Modalidade 7. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 5, em que os anticorpos bloqueiam a ligação de CD112 a TIGIT.

[0012] Modalidade 8. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 5, em que os anticorpos bloqueiam a ligação de CD155 e de CD112 a TIGIT.

[0013] Modalidade 9. A composição de qualquer uma das modalidades 1 to 8, em que os anticorpos competem pela ligação a TIGIT humano com um anticorpo que compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

[0014] Modalidade 10. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 9, em que os anticorpos, quando ligados a TIGIT humano, ligam-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0015] Modalidade 11. A composição da modalidade 10, em que os anticorpos se ligam a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0016] Modalidade 12. A composição da modalidade 10 ou modalidade 11, em que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

[0017] Modalidade 13. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 12, em que os anticorpos se ligam a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0018] Modalidade 14. Uma composição que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que os anticorpos, quando ligados a TIGIT, ligam-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

[0019] Modalidade 15. A composição da modalidade 14, em que os anticorpos se ligam a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0020] Modalidade 16. A composição da modalidade 14 ou modalidade 15, em que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

[0021] Modalidade 17. Uma composição compreendendo anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que os anticorpos se ligam a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

[0022] Modalidade 18. A composição da modalidade 13 ou modalidade 17, em que o epítopo compreende Phe na posição 81.

[0023] Modalidade 19. A composição de qualquer uma das modalidades 13, 17 e 18, em que o epítopo compreende Lys ou Ser na posição 82.

[0024] Modalidade 20. A composição de qualquer uma das modalidades 13 e 17 a 19, em que o epítopo compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82.

[0025] Modalidade 21. A composição da modalidade 20, em que o epítopo compreende Phe81 e Lys82.

[0026] Modalidade 22. A composição de qualquer uma das modalidades 13 e 17 a 21, em que o epítopo é um epítopo descontínuo.

[0027] Modalidade 23. A composição de qualquer uma das modalidades 13 e 17 a 22, em que os anticorpos se ligam a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda uma ou mais das posições de aminoácidos 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 ou 93.

[0028] Modalidade 24. A composição da modalidade 23, em que o epítopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

[0029] Modalidade 25. A composição da modalidade 24, em que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

[0030] Modalidade 26. A composição da modalidade 24, em que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 e Ala86.

[0031] Modalidade 27. A composição de qualquer uma das modalidades 13 e 17 a 26, em que o epítopo compreende a sequência ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO: 258).

[0032] Modalidade 28. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 27, em que o TIGIT humano compreende a sequência de SEQ ID NO: 218.

[0033] Modalidade 29. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 28, em que cada um dos anticorpos compreende uma ou mais dentre:

(a) uma CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma

sequência selecionada dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 e SEQ ID NO:295;

(c) uma CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 e SEQ ID NO:296;

(d) uma CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 e SEQ ID NO:287;

(e) uma CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência

selecionada dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 e SEQ ID NO:288; ou

(f) uma CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 e SEQ ID NO:215.

[0034] Modalidade 30. A composição da modalidade 29, em que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 e SEQ ID NO:295;

(c) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 e SEQ ID NO:296;

(d) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:67 e SEQ ID NO:287;

(e) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:69 e SEQ ID NO:288; e/ou

(f) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[0035] Modalidade 31. A composição da modalidade 29 ou modalidade 30, em que cada um dos anticorpos compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 22, 24, 26, 31, 33 e 35, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 40, 42, 44, 49, 51 e 53, respectivamente; ou

(d) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(e) SEQ ID NOs: 283, 285, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(f) SEQ ID NOs: 284, 60, 286, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(g) SEQ ID NOs: 76, 78, 80, 85, 87 e 89, respectivamente; ou

(h) SEQ ID NOs: 94, 96, 98, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(i) SEQ ID NOs: 112, 114, 116, 121, 123 e 125, respectivamente; ou

(j) SEQ ID NOs: 130, 132, 134, 139, 141 e 143, respectivamente; ou

(k) SEQ ID NOs: 148, 150, 152, 157, 159 e 161, respectivamente; ou

(l) SEQ ID NOs: 166, 168, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(m) SEQ ID NOs: 184, 186, 188, 193, 195 e 197, respectivamente; ou

(n) SEQ ID NOs: 202, 204, 206, 211, 213 e 215, respectivamente; ou

(o) SEQ ID NOs: 221, 222, 223, 13, 15 e 17, respectivamente;

ou

(p) SEQ ID NOs: 224, 225, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(q) SEQ ID NOs: 293, 297, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(r) SEQ ID NOs: 294, 225, 286, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(s) SEQ ID NOs: 226, 227, 228, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(t) SEQ ID NOs: 289, 291, 228, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(u) SEQ ID NOs: 290, 227, 292, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(v) SEQ ID NOs: 224, 229, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(w) SEQ ID NOs: 293, 295, 230, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(x) SEQ ID NOs: 294, 229, 296, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(y) SEQ ID NOs: 224, 227, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(z) SEQ ID NOs: 293, 290, 230, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(aa) SEQ ID NOs: 294, 290, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(bb) SEQ ID NOs: 231, 232, 235, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(cc) SEQ ID NOs: 233, 234, 236, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(dd) SEQ ID NOs: 233, 234, 237, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(ee) SEQ ID NOs: 166, 238, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(ff) SEQ ID NOs: 239, 240, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(gg) SEQ ID NOs: 239, 240, 241, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(hh) SEQ ID NOs: 239, 240, 242, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(ii) SEQ ID NOs: 243, 168, 244, 175, 177 e 179, respectivamente.

[0036] Modalidade 32. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 31, em que cada um dos anticorpos compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 283, 285, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 284, 60, 286, 67, 69 e 71, respectivamente.

[0037] Modalidade 33. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 32, em que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID

NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257; e/ou

(b) uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208.

[0038] Modalidade 34. A composição de qualquer uma das modalidades 1 to 33, em que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID

NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:208.

Modalidade 35. A composição da modalidade 34, em que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ

ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:190;

ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:208.

[0039] Modalidade 36. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 35, em que cada um dos anticorpos compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64.

[0040] Modalidade 37. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 36, em que os anticorpos são anticorpos IgG.

[0041] Modalidade 38. A composição da modalidade 37, em que os anticorpos são anticorpos IgG1 ou anticorpos IgG3.

[0042] Modalidade 39. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 38, em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[0043] Modalidade 40. A composição da modalidade 39, em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[0044] Modalidade 41. A composição da modalidade 39, em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[0045] Modalidade 42. Uma composição que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%,

pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados e em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[0046] Modalidade 43. Uma composição que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados e em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[0047] Modalidade 44. A composição de qualquer uma das modalidades 1 to 43, em que os anticorpos exibem sinergia com um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

[0048] Modalidade 45. A composição da modalidade 44, em que a sinergia é determinada por meio de um ensaio que compreende colocar em contato uma cocultura compreendendo (i) células Jurkat efetoras que expressam PD-1, TIGIT e CD226, em que as células Jurkat efetoras compreendem um gene repórter luciferase direcionado pelo promotor de IL-2; e (ii) células CHO-K1 apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) expressando um ativador de TCR, PD-L1 e CD155; com a composição e um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

[0049] Modalidade 46. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 45, em que células T reguladoras (Treg) são depletadas de PBMCs humanas quando em contato com a composição.

[0050] Modalidade 47. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 46, em que a expressão de MCP1, IL-8 e MIP1α é

aumentada em PBMCs humanas quando em contato com a composição.

[0051] Modalidade 48. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 47, em que monócitos/macrófagos são ativados quando estão em contato com a composição.

[0052] Modalidade 49. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 48, em que CD86 e MHCII são regulados positivamente quando monócitos/macrófagos CD14+ estão em contato com a composição.

[0053] Modalidade 50. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 49, em que monócitos/macrófagos CD14+ quando em contato com a composição amadurecem tornando-se células apresentadoras de antígeno.

[0054] Modalidade 51. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 50, em que as células T de memória quando em contato com a composição mostram produção aumentada de IFNγ em resposta ao antígeno.

[0055] Modalidade 52. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 51, em que as células T de memória quando em contato com a composição demonstram resposta reforçada ao antígeno.

[0056] Modalidade 53. A composição de qualquer uma das modalidades 1 to 52, em que células T CD8+ efetoras de memória e/ou células T CD4+ efetoras de memória são aumentadas em tumores quando estão em contato com a composição.

[0057] Modalidade 54. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 53, em que a composição reforça uma resposta Th1 em um animal a que foi administrada a composição.

[0058] Modalidade 55. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 54, em que os anticorpos da composição têm menor afinidade de ligação por FcγRIIa e/ou FcγRIIb quando comparado aos mesmos anticorpos anti-TIGIT que não são afucosilados.

[0059] Modalidade 56. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 55, em que a composição medeia a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) de células que expressam TIGIT na presença de monócitos-macrófagos.

[0060] Modalidade 57. The composição de qualquer uma das modalidades 1 a 56, em que os anticorpos são monoclonais.

[0061] Modalidade 58. The composição de qualquer uma das modalidades 1 a 57, em que os anticorpos são anticorpos totalmente humanos.

[0062] Modalidade 59. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 58, em que os anticorpos são anticorpos quiméricos.

[0063] Modalidade 60. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 28 e 44 a 59, em que os anticorpos são humanizados.

[0064] Modalidade 61. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 60, em que os anticorpos são fragmentos de anticorpo.

[0065] Modalidade 62. A composição da modalidade 61, em que os fragmentos de anticorpo são Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv ou diabodies.

[0066] Modalidade 63. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 62, em que os anticorpos são anticorpos biespecíficos.

[0067] Modalidade 64. A composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63, em que os anticorpos são conjugados anticorpo-fármaco.

[0068] Modalidade 65. Um anticorpo que se liga ao TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), em que o anticorpo tem uma afinidade de ligação (K_D) por TIGIT humano inferior a 5 nM e em que o anticorpo é afucosilado.

[0069] Modalidade 66. O anticorpo da modalidade 65, em que o anticorpo tem uma K_D por TIGIT humano inferior a 1 nM.

[0070] Modalidade 67. O anticorpo da modalidade 66, em que o anticorpo tem uma K_D por TIGIT humano inferior a 100 pM.

[0071] Modalidade 68. O anticorpo de qualquer uma das modalidades

65 a 67, em que o anticorpo exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

[0072] Modalidade 69. O anticorpo da modalidade 68, em que o anticorpo exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

[0073] Modalidade 70. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 69, em que o anticorpo bloqueia a ligação de CD155 a TIGIT.

[0074] Modalidade 71. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 70, em que o anticorpo bloqueia a ligação de CD112 a TIGIT.

[0075] Modalidade 72. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 71, em que o anticorpo bloqueia a ligação de CD155 e de CD112 a TIGIT.

[0076] Modalidade 73. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 72, em que o anticorpo compete pela ligação a TIGIT humano com um anticorpo que compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

[0077] Modalidade 74. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 73, em que, quando ligado a TIGIT humano, liga-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0078] Modalidade 75. O anticorpo da modalidade 74, em que o anticorpo se liga a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0079] Modalidade 76. O anticorpo da modalidade 74 ou modalidade 75, em que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

[0080] Modalidade 77. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 76, em que o anticorpo se liga a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0081] Modalidade 78. Um anticorpo que se liga ao TIGIT humano,

em que, quando ligado a TIGIT humano, liga-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que o anticorpo é afucosilado.

[0082] Modalidade 79. O anticorpo da modalidade 78, em que o anticorpo se liga a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

[0083] Modalidade 80. O anticorpo da modalidade 78 ou modalidade 79, em que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

[0084] Modalidade 81. Um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, em que o anticorpo se liga a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que o anticorpo é afucosilado.

[0085] Modalidade 82. O anticorpo da modalidade 77 ou modalidade 81, em que o epítopo compreende Phe na posição 81.

[0086] Modalidade 83. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 77, 81 e 82, em que o epítopo compreende Lys ou Ser na posição 82.

[0087] Modalidade 84. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 77 e 81 a 83, em que o epítopo compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82.

[0088] Modalidade 85. O anticorpo da modalidade 84, em que o epítopo compreende Phe81 e Lys82.

[0089] Modalidade 86. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 77 e 81 a 85, em que o epítopo é um epítopo descontínuo.

[0090] Modalidade 87. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 77 e 81 a 86, em que o anticorpo se liga a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda uma ou mais das posições de aminoácidos 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 ou 93.

[0091] Modalidade 88. O anticorpo da modalidade 87, em que o epítopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87,

Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

[0092] Modalidade 89. O anticorpo da modalidade 88, em que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

[0093] Modalidade 90. O anticorpo da modalidade 88, em que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 e Ala86.

[0094] Modalidade 91. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 77 e 81 a 90, em que o epítopo compreende a sequência ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO: 258).

[0095] Modalidade 92. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 91, em que TIGIT humano compreende a sequência de SEQ ID NO: 218.

[0096] Modalidade 93. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 92, em que o anticorpo compreende uma ou mais dentre:

(a) uma CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID

NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 e SEQ ID NO:295;

(c) uma CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 e SEQ ID NO:296;

(d) uma CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 e SEQ ID NO:287;

(e) uma CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 e SEQ ID NO:288; ou

(f) uma CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 e SEQ ID NO:215.

[0097] Modalidade 94. O anticorpo da modalidade 93, em que o anticorpo compreende:

(d) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID

NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(e) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 e SEQ ID NO:295;

(f) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 e SEQ ID NO:296;

(g) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:67 e SEQ ID NO:287;

(h) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:69 e SEQ ID NO:288; e/ou

(i) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[0098] Modalidade 95. O anticorpo da modalidade 94, em que o anticorpo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 22, 24, 26, 31, 33 e 35, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 40, 42, 44, 49, 51 e 53, respectivamente; ou

(d) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(e) SEQ ID NOs: 76, 78, 80, 85, 87 e 89, respectivamente; ou

(f) SEQ ID NOs: 94, 96, 98, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(g) SEQ ID NOs: 112, 114, 116, 121, 123 e 125, respectivamente; ou

(h) SEQ ID NOs: 130, 132, 134, 139, 141 e 143, respectivamente; ou

(i) SEQ ID NOs: 148, 150, 152, 157, 159 e 161, respectivamente; ou

(j) SEQ ID NOs: 166, 168, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(k) SEQ ID NOs: 184, 186, 188, 193, 195 e 197, respectivamente; ou

(l) SEQ ID NOs: 202, 204, 206, 211, 213 e 215, respectivamente; ou

(m) SEQ ID NOs: 221, 222, 223, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(n) SEQ ID NOs: 224, 225, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(o) SEQ ID NOs: 226, 227, 228, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(p) SEQ ID NOs: 224, 229, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(q) SEQ ID NOs: 224, 227, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(r) SEQ ID NOs: 231, 232, 235, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(s) SEQ ID NOs: 233, 234, 236, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(t) SEQ ID NOs: 233, 234, 237, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(u) SEQ ID NOs: 166, 238, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(v) SEQ ID NOs: 239, 240, 170, 175, 177 e 179,

respectivamente; ou

(w) SEQ ID NOs: 239, 240, 241, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(x) SEQ ID NOs: 239, 240, 242, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(y) SEQ ID NOs: 243, 168, 244, 175, 177 e 179, respectivamente.

[0099] Modalidade 96. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 95, em que o anticorpo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(j) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(k) SEQ ID NOs: 283, 285, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(l) SEQ ID NOs: 284, 60, 286, 67, 69 e 71, respectivamente.

[00100] Modalidade 97. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 96, em que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257; e/ou

(b) uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID

NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208.

[00101] Modalidade 98. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 97, em que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência

com SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:208.

[00102] Modalidade 99. O anticorpo da modalidade 98, em que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a

sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:208.

[00103] Modalidade 100. O anticorpo de qualquer uma das

modalidades 65 a 99, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64.

[00104] Modalidade 101. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 100, em que o anticorpo é um anticorpo IgG.

[00105] Modalidade 102. O anticorpo da modalidade 101, em que o anticorpo é um anticorpo IgG1 ou um anticorpo IgG3.

[00106] Modalidade 103. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 102, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00107] Modalidade 104. O anticorpo da modalidade 103, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00108] Modalidade 105. O anticorpo da modalidade 103, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00109] Modalidade 106. Um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00110] Modalidade 107. Um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve

compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00111] Modalidade 108. Um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00112] Modalidade 109. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 108, em que o anticorpo exibe sinergia com um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

[00113] Modalidade 110. O anticorpo da modalidade 109, em que a sinergia é determinada por meio de um ensaio que compreende colocar em contato uma cocultura compreendendo (i) células Jurkat efetoras que expressam PD-1, TIGIT e CD226, em que a células Jurkat efetoras compreendem um gene repórter luciferase direcionado pelo promotor de IL-2; e (ii) células CHO-K1 apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) expressando um ativador de TCR, PD-L1 e CD155; com a composição e um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

[00114] Modalidade 111. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 110, em que células T reguladoras (Treg) são depletadas de PBMCs humanas quando em contato com o anticorpo.

[00115] Modalidade 112. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 111, em que a expressão de MCP1, IL-8 e MIP1α é aumentada em PBMCs humanas quando em contato com o anticorpo.

[00116] Modalidade 113. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 112, em que monócitos/macrófagos são ativados quando estão em contato com o anticorpo.

[00117] Modalidade 114. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 113, em que CD86 e MHCII são regulados positivamente quando monócitos/macrófagos CD14+ estão em contato com o anticorpo.

[00118] Modalidade 115. O anticorpo de qualquer uma das

modalidades 65 a 114, em que monócitos/macrófagos CD14+ quando em contato com o anticorpo amadurecem tornando-se células apresentadoras de antígeno.

[00119] Modalidade 116. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 115, em que as células T de memória quando em contato com o anticorpo mostram produção aumentada de IFNγ em resposta ao antígeno.

[00120] Modalidade 117. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 116, em que as células T de memória quando em contato com o anticorpo demonstram resposta reforçada ao antígeno.

[00121] Modalidade 118. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 117, em que células T CD8+ efetoras de memória e/ou células T CD4+ efetoras de memória são aumentadas em tumores quando estão em contato com o anticorpo.

[00122] Modalidade 119. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 118, em que o anticorpo reforça uma resposta Th1 em um animal a que foi administrado o anticorpo.

[00123] Modalidade 120. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 119, em que o anticorpo tem menor afinidade de ligação por FcγRIIa e/ou FcγRIIb quando comparado ao mesmo anticorpo anti-TIGIT que não é afucosilado.

[00124] Modalidade 121. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 120, em que a composição medeia a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) de células que expressam TIGIT na presença de monócitos-macrófagos.

[00125] Modalidade 122. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 121, em que o anticorpo é monoclonal.

[00126] Modalidade 123. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 122, em que o anticorpo é um anticorpo totalmente humano.

[00127] Modalidade 124. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 123, em que o anticorpo é um anticorpo quimérico.

[00128] Modalidade 125. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 92 e 109 a 124, em que o anticorpo é humanizado.

[00129] Modalidade 126. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 125, em que o anticorpo é um fragmento de anticorpo.

[00130] Modalidade 127. O anticorpo da modalidade 126, em que o fragmento de anticorpo é um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um scFv ou um diabody.

[00131] Modalidade 128. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 127, em que o anticorpo é um anticorpo biespecífico.

[00132] Modalidade 129. O anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128, em que o anticorpo é um conjugado anticorpo-fármaco.

[00133] Modalidade 130. Uma formulação farmacêutica que compreende a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 64 ou o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 129 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00134] Modalidade 131. Um polinucleotídeo isolado que codifica (i) a cadeia pesada do anticorpo de qualquer uma das modalidades 106 a 108; (ii) a cadeia leve do anticorpo de qualquer uma das modalidades 106 a 108; ou (iii) a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo de qualquer uma das modalidades 106 a 108.

[00135] Modalidade 132. O polinucleotídeo isolado da modalidade 131, em que o polinucleotídeo compreende (i) uma sequência de nucleotídeos selecionada dentre SEQ ID NOs: 259, 261, 163, 265, 267, 269 e 271; ou (ii) uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 273; ou (iii) uma sequência de nucleotídeos selecionada dentre SEQ ID NOs: 259, 261, 263, 265, 267, 269 e 271 e uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 273.

[00136] Modalidade 133. Um vetor que compreende o polinucleotídeo da modalidade 131 ou modalidade 132.

[00137] Modalidade 134. Uma célula hospedeira isolada que compreende o polinucleotídeo isolado da modalidade 131 ou modalidade 132, ou o vector da modalidade 133.

[00138] Modalidade 135. Uma célula hospedeira isolada que expressa o anticorpo de qualquer uma das modalidades 106-108.

[00139] Modalidade 136. A célula hospedeira da modalidade 134 ou modalidade 135, que é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

[00140] Modalidade 137. Um método para a produção de um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, o qual compreende incubar a célula hospedeira de qualquer uma das modalidades 134 a 136 sob condições adequadas para a produção do anticorpo.

[00141] Modalidade 138. O método da modalidade 137, em que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

[00142] Modalidade 139. O método da modalidade 137, em que a célula hospedeira é cultivada na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados.

[00143] Modalidade 140. O método de qualquer uma das modalidades 137 a 139, o qual compreende ainda isolar os anticorpos.

[00144] Modalidade 141. Uma composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos pelo método de qualquer uma das modalidades 138 a 140.

[00145] Modalidade 142. Uma composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos

96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos pelo método compreendendo incubar a célula hospedeira da modalidade 134 ou modalidade 135 sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados e isolar os anticorpos para formar a composição de anticorpos isolados.

[00146] Modalidade 143. A composição da modalidade 142, em que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

[00147] Modalidade 144. A composição da modalidade 142, em que a célula hospedeira é cultivada na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados.

[00148] Modalidade 145. Uma célula hospedeira que compreende um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica (i) os anticorpos da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63 ou (ii) o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128, em que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

[00149] Modalidade 146. A célula hospedeira da modalidade 145, em que o polinucleotídeo é um vetor.

[00150] Modalidade 147. A célula hospedeira que expressa (i) os anticorpos da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63 ou (ii) o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128, em que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

[00151] Modalidade 148. A célula hospedeira de qualquer uma das modalidades 145 a 147, em que a célula hospedeira compreende:

(a) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:269 ou SEQ ID NO:271; e/ou

(b) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:209 ou SEQ ID NO:273.

[00152] Modalidade 149. Um método para a produção de anticorpos afucosilados que se ligam a TIGIT, o qual compreende cultivar a célula hospedeira de qualquer uma das modalidades 145 a 148 sob condições adequadas para a produção dos anticorpos afucosilados.

[00153] Modalidade 150. Um método para a produção de anticorpos afucosilados que se ligam a TIGIT, o qual compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira compreende um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica (i) os anticorpos da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63 ou (ii) o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128.

[00154] Modalidade 151. O método da modalidade 150, em que o polinucleotídeo é um vetor.

[00155] Modalidade 152. Um método para a produção de anticorpos afucosilados que se ligam a TIGIT, o qual compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira expressa (i) os anticorpos da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63 ou (ii) o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128.

[00156] Modalidade 153. O método de qualquer uma das modalidades 150 a 152, em que a célula hospedeira compreende:

(a) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ

ID NO:182, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:269 ou SEQ ID NO:271; e/ou

(b) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:209 ou SEQ ID NO:273.

[00157] Modalidade 154. O método de qualquer uma das modalidades 150 a 153, em que o análogo de fucose é 2-fluorofucose.

[00158] Modalidade 155. O método de qualquer uma das modalidades 149 a 154, o qual compreende ainda isolar os anticorpos afucosilados.

[00159] Modalidade 156. Uma composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos pelo método de qualquer uma das modalidades 149 a 155.

[00160] Modalidade 157. Uma composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos por um método que compreende incubar a célula hospedeira de qualquer uma das modalidades 145 a 147 sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados e isolar os anticorpos para formar a composição de anticorpos isolados.

[00161] Modalidade 158. Uma composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos

na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos por um método que compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira compreende um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica (i) os anticorpos da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63 ou (ii) o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128.

[00162] Modalidade 159. Uma composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos por um método que compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira expressa (i) os anticorpos da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 63 ou (ii) o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 128.

[00163] Modalidade 160. Um kit compreendendo:

a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 64, o anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 129 ou a composição farmacêutica da modalidade 130; e

um agente terapêutico adicional.

[00164] Modalidade 161. O kit da modalidade 160, em que o agente terapêutico adicional é um agente antineoplásico.

[00165] Modalidade 162. O kit da modalidade 160 ou modalidade 161, em que o agente terapêutico adicional é um anticorpo.

[00166] Modalidade 163. O kit de qualquer uma das modalidades 160 a 162, em que o agente terapêutico adicional é um antagonista ou um inibidor de um coinibidor de células T; um agonista de um coativador de células T;

uma citocina imunoestimuladora; ou SGN-2FF.

[00167] Modalidade 164. O kit de qualquer uma das modalidades 160 a 163, em que o agente terapêutico adicional se liga a uma proteína selecionada dentre CD25, PD-1, PD-L1, Tim3, Lag3, CTLA4, 41BB, OX40, CD3, CD40, CD47M, GM-CSF, CSF1R, TLR, STING, RIGI, TAM receptor quinase, NKG2A, NKG2D, GD2, HER2, EGFR, PDGFRα, SLAMF7, VEGF, CTLA-4, CD20, cCLB8, KIR e CD52.

[00168] Modalidade 165. O kit de qualquer uma das modalidades 160 a 164, em que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-Tim3, anticorpo anti-Lag3, anticorpo anti-CTLA4, anticorpo anti-41BB, anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD47M, anticorpo anti-CSF1R, anticorpo anti-TLR, anticorpo anti-STING, anticorpo anti-RIGI, anticorpo anti-receptor quinase TAM, anticorpo anti-NKG2A, um anticorpo anti-NKG2D, um anticorpo anti-GD2, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-PDGFR-α, um anticorpo anti-SLAMF7, um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-cCLB8, um anticorpo anti-KIR e um anticorpo anti-CD52.

[00169] Modalidade 166. O kit de qualquer uma das modalidades 160 a 165, em que o agente terapêutico adicional compreende uma citocina selecionada dentre IL-15, IL-21, IL-2, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-1, IL-3, IL-12 e IFNγ.

[00170] Modalidade 167. O kit de qualquer uma das modalidades 160 a 165, em que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre SEA-CD40, avelumabe, durvalumabe, nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, atezolizumabe, Hul4.18K322A, Hu3F8, dinituximabe, trastuzumabe, cetuximabe, olaratumabe, necitumumabe, elotuzumabe, ramucirumabe, pertuzumabe, ipilimumabe, bevacizumabe, rituximabe, obinutuzumabe,

siltuximabe, ofatumumabe, lirilumabe e alentuzumabe.

[00171] Modalidade 168. O kit da modalidade 160 ou modalidade 161, em que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um agente alquilante (p. ex., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, bussulfano, melfalano, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosureias ou temozolomida), uma antraciclina (p. ex., doxorrubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirrubicina ou mitoxantrona), um desorganizador do citoesqueleto (p. ex., paclitaxel ou docetaxel), um inibidor de histona desacetilase (p. ex., vorinostat ou romidepsina), um inibidor de topoisomerase (p. ex., irinotecano, topotecano, ansacrina, etoposídeo ou teniposídeo), um inibidor de quinase (p. ex., bortezomibe, erlotinibe, gefitinibe, imatinibe, vemurafenibe ou vismodegibe), um análogo de nucleosídeo ou análogo do precursor (p. ex., azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, mercaptopurina, metotrexato ou tioguanina), um antibiótico peptídico (p. ex., actinomicina ou bleomicina), um agente à base de platina (p. ex., cisplatina, oxaloplatina ou carboplatina) ou um alcaloide de planta (p. ex., vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel ou docetaxel), galardina, talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

[00172] Modalidade 169. Um método para o tratamento de um câncer em um indivíduo, o qual compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de qualquer uma das modalidades 1 a 64, do anticorpo de qualquer uma das modalidades 65 a 129 ou da composição farmacêutica da modalidade 130.

[00173] Modalidade 170. O método da modalidade 169, em que o câncer é um câncer que é enriquecido com a expressão de CD112 ou CD155.

[00174] Modalidade 171. O método da modalidade 169 ou modalidade 170, em que o câncer é um câncer que é enriquecido com células T ou células *natural killer* (NK) que expressam TIGIT.

[00175] Modalidade 172. O método de qualquer uma das modalidades 169 a 171, em que o câncer é câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de útero, câncer cervical, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de testículo, câncer de esôfago, câncer gastrointestinal, câncer gástrico, câncer de pâncreas, câncer colorretal, câncer de cólon, câncer de rim, carcinoma renal de células claras, câncer da cabeça e pescoço, câncer de pulmão, adenocarcinoma de pulmão, câncer de estômago, câncer de células germinativas, câncer ósseo, câncer de fígado, câncer de tireoide, câncer de pele, melanoma, neoplasia do sistema nervoso central, mesotelioma, linfoma, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin, mieloma ou sarcoma.

[00176] Modalidade 173. O método da modalidade 172, em que o câncer é linfoma, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular ou linfoma de Hodgkin.

[00177] Modalidade 174. O método de qualquer uma das modalidades 169 a 173, o qual compreende ainda administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico adicional.

[00178] Modalidade 175. O método da modalidade 174, em que o agente terapêutico adicional é um agente antineoplásico.

[00179] Modalidade 176. O método da modalidade 174 ou modalidade 175, em que o agente terapêutico adicional é um anticorpo.

[00180] Modalidade 177. O método de qualquer uma das modalidades 174 a 176, em que o agente terapêutico adicional é um antagonista ou um inibidor de um coinibidor de células T; um agonista de um coativador de células T; ou uma citocina imunoestimuladora; ou SGN-2FF.

[00181] Modalidade 178. O método de qualquer uma das modalidades 174 a 177, em que o agente terapêutico adicional se liga a uma proteína selecionada dentre CD25, PD-1, PD-L1, Tim3, Lag3, CTLA4, 41BB, OX40, CD3, CD40, CD47M, GM-CSF, CSF1R, TLR, STING, RIGI, receptor

quinase TAM, NKG2A, NKG2D, GD2, HER2, EGFR, PDGFRα, SLAMF7, VEGF, CTLA-4, CD20, cCLB8, KIR e CD52.

[00182] Modalidade 179. O método da modalidade 178, em que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-Tim3, anticorpo anti-Lag3, anticorpo anti-CTLA4, anticorpo anti-41BB, anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD47M, anticorpo anti-CSF1R, anticorpo anti-TLR, anticorpo anti-STING, anticorpo anti-RIGI, anticorpo anti-receptor quinase TAM, anticorpo anti-NKG2A, um anticorpo anti-NKG2D, um anticorpo anti-GD2, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-PDGFR-α, um anticorpo anti-SLAMF7, um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-cCLB8, um anticorpo anti-KIR e um anticorpo anti-CD52.

[00183] Modalidade 180. O método da modalidade 174 ou modalidade 175, em que o agente terapêutico adicional compreende uma citocina selecionada dentre IL-15, IL-21, IL-2, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-1, IL-3, IL-12 e IFNγ.

[00184] Modalidade 181 O método de qualquer uma das modalidades 174 a 179, em que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre SEA-CD40, avelumabe, durvalumabe, nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, atezolizumabe, Hul4.18K322A, Hu3F8, dinituximabe, trastuzumabe, cetuximabe, olaratumabe, necitumumabe, elotuzumabe, ramucirumabe, pertuzumabe, ipilimumabe, bevacizumabe, rituximabe, obinutuzumabe, siltuximabe, ofatumumabe, lirilumabe e alentuzumabe.

[00185] Modalidade 182. O método da modalidade 174 ou modalidade 175, em que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um agente alquilante (p. ex., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, bussulfano, melfalano, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosureias ou temozolomida), uma antraciclina (p. ex., doxorrubicina, adriamicina,

daunorrubicina, epirrubicina ou mitoxantrona), um desorganizador do citoesqueleto (p. ex., paclitaxel ou docetaxel), um inibidor de histona desacetilase (p. ex., vorinostat ou romidepsina), um inibidor de topoisomerase (p. ex., irinotecano, topotecano, ansacrina, etoposídeo ou teniposídeo), um inibidor de quinase (p. ex., bortezomibe, erlotinibe, gefitinibe, imatinibe, vemurafenibe ou vismodegibe), um análogo de nucleosídeo ou análogo do precursor (p. ex., azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, mercaptopurina, metotrexato ou tioguanina), um antibiótico peptídico (p. ex., actinomicina ou bleomicina), um agente à base de platina (p. ex., cisplatina, oxaloplatina ou carboplatina) ou um alcaloide de planta (p. ex., vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel ou docetaxel), galardina, talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

[00186] Modalidade 183. O método de qualquer uma das modalidades 174 a 182, em que a composição, o anticorpo ou a composição farmacêutica é administrado simultaneamente com o agente terapêutico adicional.

[00187] Modalidade 184. O método de qualquer uma das modalidades 174 a 183, em que a composição, o anticorpo ou a composição farmacêutica é administrado sequencialmente ao agente terapêutico adicional.

Breve descrição dos desenhos

[00188] Figura 1. Ligação de 65 clones do anticorpo anti-TIGIT e um anticorpo controle de isótipo irrelevante a células HEK 293 projetadas para expressar TIGIT humano (painel superior), TIGIT de macaco Cynomolgus (painel do meio) e TIGIT de camundongo (painel inferior).

[00189] Figura 2. Ligação de 65 clones do anticorpo anti-TIGIT e um anticorpo controle de isótipo irrelevante a células T humanas primárias (painel superior), células T de macaco Cynomolgus (painel do meio) e células T de camundongo (painel inferior). Para o painel inferior, 35 de 65 clones foram avaliados. Dos 35 clones avaliados, 5 dos 35 não se ligaram à proteína

mTIGIT-Fc (clones 20, 27, 55, 56 e 60), como indicado pelas barras de cor verde claro.

[00190] Figura 3A-3D. (A-C) Valores de titulação da ligação de oito clones do anticorpo anti-TIGIT (clones 2, 5, 13, 16, 17, 20, 25 e 54) a TIGIT humano (A), de camundongo (B) e macaco Cynomolgus (C) expressos em células HEK 293. Os resultados são mostrados para poços em amostra única (*singlicate*). (D) Valores de EC50 de oito clones do anticorpo anti-TIGIT (clones 2, 5, 13, 16, 17, 20, 25 e 54) contra TIGIT humano, de camundongo e de macaco Cynomolgus expressos em células HEK 293.

[00191] Figura 4. Titulação de ligação dos clones 13 e 25 do anticorpo anti-TIGIT a células T esplênicas ativadas de camundongo. Os resultados são mostrados para poços em amostra única. O Clone 13 obteve uma EC50 de 0,24 µg/mL. O Clone 25 obteve uma EC50 de 2,28 µg/mL.

[00192] Figura 5A-5B. Anticorpos anti-TIGIT bloquearam a interação de CD155 com TIGIT expresso em células HEK 293, tanto a ligação de CD155 humano a células HEK 293 expressando TIGIT humano (A) e a ligação de CD155 de camundongos a células HEK 293 expressando TIGIT de camundongo (B). Os resultados são mostrados para poços em amostra única.

[00193] Figura 6. Anticorpos anti-TIGIT bloquearam a interação de CD112 humano com TIGIT humano expresso em células HEK 293. Os resultados são mostrados para poços em amostra única.

[00194] Figura 7A-7B. (A) Painel superior: Anticorpos anti-TIGIT selecionados bloqueiam efetivamente o envolvimento TIGIT-CD155, resultando na ativação de células T, como medidas por uma indução > 1,5 vez na atividade da luciferase. Aproximadamente 12 clones revelarão indução >1,5 vez no bioensaio. Dois clones não bloquearem a interação TIGIT-CD155 no ensaio ForteBio (barras rosadas). A indução relativa (*fold induction*) foi medida em relação ao Ab controle. A média e o DP são de duas réplicas de cada experimento; os anticorpos estavam a 20 µg/mL. Barra cinza = hIgG1

como isótipo controle. Barra preta = nenhum anticorpo controle (definido como basal). Painel inferior: Gráfico de correlação do bioensaio de bloqueio TIGIT/CD155 *versus* afinidade de TIGIT-Fc. A atividade no bioensaio correlacionou-se com a afinidade para a proteína recombinante. (B) Resposta à dose de 12 clones anti-TIGIT selecionados no bioensaio de bloqueio TIGIT/CD155. Os clones 13 e 25, que demonstraram forte ligação a todas as três espécies, revelaram boa atividade no bioensaio. A média e DP são de três réplicas de cada poço.

[00195] Figura 8. Anticorpos anti-TIGIT selecionados atuam em sinergia com anti-PD-1, resultando na ativação de células T. A média e DP são de três réplicas de cada poço. O clone 13 e o clone 25 mostraram sinergia com anti-PD-1 no bioensaio da combinação.

[00196] Figura 9A-9H. (A-D) Titulação da ligação (A-C) e valores de EC50 (D) para ligação a TIGIT humano (A), de camundongo (B) e macaco Cynomolgus (C) expresso em células HEK 293 para o clone 13 anti-TIGIT totalmente humano ("c13 hIgG1") e quimeras de IgG1 de camundongo ("c13 mIgG1") e IgG2a de camundongo ("c13 mIgG2a") do clone 13. A média e DP são de duas réplicas de cada poço. (E-F) Os anticorpos c13 hIgG1, c13 mIgG1 e c13 mIgG2a bloquearam a interação de CD155 com TIGIT expresso em células HEK 293, pela ligação de CD155 humano a células HEK 293 expressando TIGIT humano (E) e a ligação de CD155 de camundongo a células HEK 293 expressando TIGIT de camundongo (F). Os resultados são para poços em amostra única. (G) Os anticorpos c13 hIgG1, c13 mIgG1 e c13 mIgG2a bloquearam a interação de CD112 humano com TIGIT humano expresso em células HEK 293. Os resultados são para poços em amostra única. (H) Resposta à dose do anticorpo parental e dos clones quiméricos anti-TIGIT c13 hIgG1, c13 mIgG1 e c13 mIgG2a no bioensaio de bloqueio TIGIT/CD155. A média e DP são de três réplicas de cada poço.

[00197] Figura 10A-10K. Anticorpos anti-TIGIT que podem envolver

receptores Fcgama ativadores mediaram a eficácia antitumoral em um modelo de tumor singênico CT26 em camundongos. (A) Volume tumoral médio por grupo. (B-K) Volume tumoral individual para os animais dos grupos 1 ao 10. RP = Resposta parcial (o volume tumoral é 50% ou menos do que seu volume no Dia 1 por três medições consecutivas e igual ou maior do que 13,5 mm^3 para uma ou mais dessas três medições). RC = Resposta completa (o volume tumoral é inferior a 13,5 mm^3 por três medições consecutivas).

[00198] Figura 11. Sensogramas de anticorpos anti-TIGIT titulados pela ligação a FcγRIIIa 158V humano por BLI. Os resultados são mostrados para o clone hIgG1 anti-TIGIT do tipo selvagem, afucosilado e LALA-PG (painéis à esquerda), clone 13 anti-TIGIT mIgG2a do tipo selvagem, afucosilado e LALA-PG (painéis no centro) e clone 13C anti-TIGIT hIgG1 do tipo selvagem (painel à direita).

[00199] Figura 12. Ligação de anticorpos anti-TIGIT mIgG2a a células CHO expressando mCD16 (a forma murina de FcγRIVa). O clone 13 mIgG2a afucosilado (quadrados pretos) ligou-se com afinidade significativamente maior quando comparado ao mIgG2a do tipo selvagem (círculos pretos) ou mIgG2a LALA-PG (triângulos pretos). Os dados sobre a ligação estão resumidos na tabela abaixo.

[00200] Figura 13. Expressão de TIGIT (painel superior), CD226 (painel do meio) e CD155 (painel inferior) por subconjuntos de células T de doadores sadios. Tregs expressaram os níveis mais altos de TIGIT, enquanto todos os conjuntos testados de células T expressaram o receptor ativador CD226. A expressão de CD155 foi em grande parte ausente.

[00201] Figura 14. Depleção de células Treg TIGIT-positivas pelo clone 13 IgG1 do tipo selvagem (círculos pretos), clone 13 IgG1 afucosilado (quadrados pretos), clone 13 IgG1 LALA-PG (triângulos pretos) e uma IgG1 humana de isótipo controle (triângulos cinzas invertidos), em várias concentrações.

[00202] Figura 15. Depleção de Tregs em experimentos de cocultura de NK/Treg alogênicas pelo clone 13 IgG1 do tipo selvagem (círculos pretos), clone 13 IgG1 afucosilado (quadrados pretos) e clone 13 IgG1 LALA-PG (triângulos pretos). O anticorpo OKT9 afucosilado (círculos claros) foi incluído como controle positivo.

[00203] Figura 16. Produção de citocinas inflamatórias MCP-1 (painel superior), IL-8 (painel do meio) e MIP1α (painel inferior) por PBMCs após o tratamento com o anticorpo clone 13 IgG1 do tipo selvagem (quadrados pretos), o anticorpo clone 13 IgG1 afucosilado (losango preto) ou o anticorpo clone 13 IgG1 LALA-PG (círculos pretos).

[00204] Figura 17. Regulação positiva dose-dependente da expressão de CD86 (painel à esquerda) e MHC classe II (painel à direita) em monócitos $CD14^+$ após o tratamento com o anticorpo clone 13 IgG1 do tipo selvagem (círculos cinzas), o anticorpo clone 13 IgG1 afucosilado (quadrados cinzas) e o anticorpo clone 13 IgG1 LALA-PG (triângulos pretos).

[00205] Figura 18A-18C. Atividade *in vivo* de anticorpos anti-TIGIT em três modelos diferentes de tumor singênico. A Figura 8A mostra o efeito do clone 13 IgG2a do tipo selvagem, do clone 13 IgG2a afucosilado e do clone 13 IgG2a LALA-PG sobre o volume tumoral no modelo de linfoma singênico A20. A Figura 8B mostra o efeito do clone 13 IgG2a do tipo selvagem, do clone 13 IgG2a afucosilado e do clone 13 IgG2a LALA-PG sobre o volume tumoral no modelo de câncer de cólon singênico CT26. A Figura 8C mostra o efeito do clone 13 IgG2a do tipo selvagem, do clone 13 IgG2a afucosilado e do clone 13 IgG2a LALA-PG sobre o volume tumoral no modelo de câncer de cólon singênico MC38. Em todos os 3 modelos, o clone 13 mIgG2a do tipo selvagem (círculos pretos) e o clone 13 mIGg2a afucosilado (losangos pretos) foram mais eficazes em controlar o tamanho do tumor quando comparados ao clone 13 IgG2a LALPG (quadrados pretos) ou animais não tratados (triângulos cinzas).

[00206] Figura 19. Atividade ADCC contra células A549 quando em contato com cetuximabe somente (quadrados claros), com a combinação de cetuximabe com o anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1 (quadrados pretos) e com um anticorpo IgG1 de isótipo controle (triângulos claros).

[00207] Figura 20. Expressão de IFNγ induzida por CMV em PBMCs expostas ao antígeno de memória (*recall*) do CMV e tratadas com anticorpo anti-PD-1 (o tratamento com pembrolizumabe é mostrado com quadrados cinzas, o tratamento com nivolumabe é mostrado em losangos cinzas) e concentrações crescentes do anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1. O tratamento com apenas o anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1 é também mostrado (quadrados pretos).

[00208] Figura 21. Expressão de IFNγ induzida por CMV em PBMCs expostas ao antígeno de memória de CMB e tratadas com concentrações crescentes dos anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 tipo selvagem (“Clone 13 IgG1”), afucosilado clone 13 IgG1 (“Clone 13 SEA IgG1”) e clone 13 IgG1 LALA-PG (“Clone 13 LALA IgG1”).

[00209] Figura 22. Expressão de IL2 em PBMCs cocultivadas sem equiparação com HLA, tratadas com concentrações crescentes dos anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13 IgG1”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 SEA IgG1”) e clone 13 IgG1 LALA-PG (“Clone 13 LALA IgG1”).

[00210] Figura 23. Indução de citocinas no plasma e tecidos de camundongos com xenoenxerto CT26 de câncer de cólon em resposta a anticorpos anti-TIGIT. Camundongos com implante de células CT26 de câncer de cólon foram tratados com o clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“WT”), o clone 13 IgG1 afucosilado (“SEA”) ou o clone 13 IgG2a LALA-PG (“LALA”), 1 mg/kg, e os níveis de citocinas foram medidos no plasma, baço e lisados do tumor.

[00211] Figura 24. Alterações em subconjuntos de células T CD8+

intratumorais e periféricas em camundongos com xenoenxerto CT26 de câncer de cólon após o tratamento com o anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 IgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”).

[00212] Figura 25. Alterações em subconjuntos de células T CD4+ intratumorais e periféricas em camundongos com xenoenxerto CT26 de câncer de cólon tratadas com o anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 IgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”).

[00213] Figura 26A-B. Alterações em subconjuntos de células T CD8+ (A) e CD4+ (B) esplênicas em camundongos com xenoenxerto CT26 de câncer de cólon após seis doses de anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 IgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”). São mostrados resultados de células CD45+ vivas com *gate* (seleção) em CD8+ ou CD4+.

[00214] Figura 27. Indução de citocinas no plasma e baço de camundongos com xenoenxerto CT26 de câncer de cólon, tratados com anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 IgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”).

[00215] Figura 28. Indução de respostas de células T antígeno-específicas em camundongos tratados com anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 IgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”).

[00216] Figura 29A-C. Atividade *in vivo* de anticorpos anti-TIGIT em três modelos diferentes de tumor singênico. A Figura 29A mostra o efeito de do clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT”), 5 mg/kg, e do clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”), 0,1 mg/kg, 1 mg/kg e 5 mg/kg, sobre o volume tumoral no modelo EMT6 singênico de câncer de mama. A Figura 29B

mostra o efeito do clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT”), 5 mg/kg, e do clone 13 IgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”), 0,1 mg/kg, 1 mg.kg e 5 mg/kg, sobre o volume tumoral no modelo E0771 singênico de câncer de mama. A Figura 29C mostra o efeito do clone 13 IgG2a do tipo selvagem, 1 mg/mL, sobre o volume tumoral em um modelo CT25 singênico de câncer de cólon mantido externamente.

[00217] Figura 30. Correlação de assinaturas moléculas de célula NK (esquerda) e célula T CD8 ativada (direita) com resposta do modelo de tumor singênico ao tratamento com anticorpo anti-TIGIT.

[00218] Figura 31. Correlação da expressão de TIGIT (esquerda) e CD155 (direita) com resposta do modelo de tumor singênico ao tratamento com anticorpo anti-TIGIT.

[00219] Figura 32. Níveis de IgG1 (painel à esquerda) e IgG2a (painel à direita) anti-OVA em camundongos após a vacinação com OVA e tratamento com anticorpo clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 mIgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 mIgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”), 1 mg/kg.

[00220] Figura 33. Expressão de citocinas após reestimulação de esplenócitos *ex vivo* de camundongos tratados por vacinação com OVA seguida por anticorpo clone 13 IgG2a do tipo selvagem (“TIGIT WT”), clone 13 mIgG2a afucosilado (“SEA TIGIT”) ou clone 13 mIgG2a LALA-PG (“LALA TIGIT”), 1 mg/kg.

[00221] Figura 34. Reexposição (*re-challenge*) de camundongos que mostraram uma resposta complete no modelo de tumor CT26 singênico após o tratamento com o anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado.

[00222] Figura 35. Depleção de Treg por anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“WT”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 IgG1 SEA”) ou clone 13 IgG1 DLE (“DLE”).

[00223] Figura 36. Depleção de Treg por anticorpos anti-TIGIT clone

13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13 WT”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 IgG1 SEA”) ou clone H5/L4 IgG1.

[00224] Figura 37. Eficácia dos anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13 WT” ou “TIGIT WT”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 SEA” ou “SGN-TGT”), anticorpo anti-PD-1 e combinações de anticorpo anti-PD-1 e clone 13 IgG1 do tipo selvagem ou clone 13 IgG1 afucosilado em um modelo de tumor MC38 em camundongos.

[00225] Figura 38A-38B. Expressão de IL-2 (Figura 38A) ou expressão de IL-10 (Figura 38B) após contato com o superantígeno peptídico enterotoxina B estafilocócica e os anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13 WT”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 SEA”), clone 13 IgG1 DLE (“DLE”) ou clone H5/L4 IgG1.

[00226] Figura 39A-39D. Ligação dos anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13 IgG1”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 SEA”), clone 13 LALA-PG (“Clone 13 LALA”), clone 13 IgG1 DLE (“Clone 13 DLE”) ou clone H5/L4 IgG1 com FcγRI (Figura 39A), FcγRIIIa V/V (Figura 39B), FcγRIIb (Figura 39C) ou FcγRIIa (Figura 39D) expressos na superfície de células CHO.

[00227] Figura 40. Fagocitose de células Jurkat TIGIT-positivas mediada pelos anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 SEA”) e clone 13 IgG1 DLE (“Clone 13 DLE”).

[00228] Figura 41. CDC de células Jurkat TIGIT-positivas mediada pelos anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (“Clone 13 IgG1”), clone 13 IgG1 afucosilado (“Clone 13 SEA”), clone 13 LALA-PG (“Clone 13 LALA-PG”), clone 13 IgG1 DLE (“Clone 13 DLE”) ou clone H5/L4 IgG1; e pelo anticorpo hB6h12.3 anti-CD47.

Descrição detalhada da invenção

I. Introdução

[00229] São providos anticorpos com alta afinidade por TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM) e exibindo ainda reatividade cruzada com qualquer ou com ambos, TIGIT de camundongo e TIGIT de macaco Cynomolgus, que foram identificados e inibem a interação entre TIGIT e CD155. Esses anticorpos também exibem sinergia com anticorpos anti-PD-1. Assim, os anticorpos anti-TIGIT aqui descritos podem ser utilizados em diversas aplicações terapêuticas, tais como para o tratamento de vários cânceres, quer como agente único ou em combinação com outro agente terapêutico. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT são afucosilados.

[00230] Consequentemente, em algumas modalidades, a presente invenção provê composições, kits e métodos de tratamento que compreendem um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, em que o anticorpo é afucosilado.

II. Definições

[00231] A menos que definidos de outra forma, os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado como comumente entendido por qualquer técnico no assunto. Ver, p. ex., Lackie, *Dictionary of Cell and Molecular Biology*, Elsevier (4ª ed. 2007); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Quaisquer métodos, dispositivo e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos podem ser utilizados na prática desta invenção.

[00232] Neste relatório descritivo, as formas no singular “um”, “uma”, “o” e “a” incluem referentes no plural a menos que o conteúdo indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, uma referência a “um anticorpo” inclui opcionalmente uma combinação de duas ou mais de tais moléculas e similares.

[00233] O termo “aproximadamente”, neste relatório descritivo, refere-se à faixa de erro habitual para o respectivo valor prontamente conhecida pela

pessoa com competência neste campo técnico.

[00234] Neste relatório descritivo, o termo "TIGIT" refere-se ao "Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM". A proteína codificada pelo gene TIGIT pertence à família CD28 dentro da superfamília Ig de proteínas. TIGIT é expresso em diversas classes de células T e em células *natural killer* (NK) e medeia seu efeito imunossupressor ao competir com CD226 pelos ligantes CD155 e CD112. Ver, Levin *et al*., *Eur. J. Immunol*., 2011, 41:902-915. TIGIT é também citado na técnica como WUCAM (*Washington University Cell Adhesion Molecule*) e VSTM3 (designação HUGO). Ver, Levin *et al*., *Eur J Immunol*, 2011, 41:902-915. Assim, uma referência a "TIGIT", por todo este pedido de patente, também inclui uma referência a WUCAM e/ou VSTM3 a menos que afirmado de outra forma ou evidente pelo contexto. As sequências de nucleotídeos e proteica de TIGIT humano são apresentadas em, p. ex., Nºs de Acesso Genbank NM173799 (SEQ ID NO:217) e NP776160 (SEQ ID NO:218), respectivamente.

[00235] O termo "anticorpo" inclui anticorpos intactos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, em que os fragmentos de ligação ao antígeno compreendem a região de ligação ao antígeno e pelo menos uma porção da região constante da cadeia pesada compreendendo asparagina (N) 297, localizada em CH2. Tipicamente, a "região variável" contém a região de ligação ao antígeno do anticorpo e está envolvida na especificidade e afinidade de ligação. Ver, *Fundamental Immunology*, 7ª Edição, Paul, ed., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (2013). As cadeias leves são tipicamente classificadas em kappa ou lambda. As cadeias pesadas são tipicamente classificadas em gama, mu, alfa, delta ou épsilon, as quais, por sua vez, definem as classes de imunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

[00236] O termo "anticorpo" também inclui moléculas bivalentes ou

biespecíficas, diabodies, triabodies e tetrabodies. Moléculas bivalentes ou biespecíficas são descritas em, p. ex., Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1547, Pack e Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31:1579, Hollinger *et al*. (1993), *PNAS. USA* 90:6444, Gruber *et al*. (1994) *J Immunol*. 152:5368, Zhu *et al*. (1997) *Protein Sci*. 6:781, Hu *et al*. (1996) *Cancer Res*. 56:3055, Adams *et al*. (1993) *Cancer Res*. 53:4026 e McCartney, *et al*. (1995) *Protein Eng*. 8:301.

[00237] O termo "anticorpo" inclui um anticorpo por si só (anticorpo nu (*naked*)) ou um anticorpo conjugado a um fármaco citotóxico ou citostático.

[00238] Um "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individualmente que compõe a população são idênticos, exceto por possíveis mutações ocorridas naturalmente que podem estar presentes em quantidades mínimas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo de ter sido obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deverá ser considerado como requisito de que a produção do anticorpo deva ser por qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser criados pelo método do hibridoma, descrito pela primeira vez por Kohler *et al*. (1975) *Nature* 256:495, ou podem ser criados por métodos do DNA recombinante (ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº 4816567). Os "anticorpos monoclonais" podem ser isolados de bibliotecas de anticorpos em fagos, utilizando as técnicas descritas em Clackson *et al*. (1991) *Nature*, 352:624-628 e Marks *et al*. (1991) *J. Mol. Biol*., 222:581-597, por exemplo, ou podem ser criados por outros métodos. Os anticorpos aqui descritos são anticorpos monoclonais.

[00239] Ligação específica de um anticorpo monoclonal com seu antígeno alvo significa uma afinidade de pelo menos 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 ou 10^{10}

M^{-1}. A ligação específica é detectavelmente de magnitude maior e pode distinguir-se da ligação não específica que ocorre com pelo menos um alvo não relacionado. A ligação específica pode ser resultante da formação de ligações entre grupos funcionais em particular ou de um encaixe espacial em particular (p. ex., tipo chave e fechadura) enquanto a ligação não específica é geralmente o resultado de forças de van der Waals.

[00240] A unidade básica estrutural do anticorpo é um tetrâmetro de subunidades. Cada tetrâmero inclui dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par com uma cadeia "leve" (aproximadamente 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável com cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos, responsável primariamente pelo reconhecimento do antígeno. Essa região variável é expressa inicialmente ligada a um peptídeo sinal clivável. A região variável sem o peptídeo sinal é, às vezes, referida como região variável madura. Assim, por exemplo, uma região variável madura da cadeia leve significa uma região variável da cadeia leve sem o peptídeo sinal da cadeia leve. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante, responsável primariamente pela função efetora.

[00241] As cadeias leves são classificadas em kappa ou lambda. As cadeias pesadas são classificadas em gama, mu, alfa, delta ou épsilon e definem o isótipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro das cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são unidas por uma região "J" de 12 ou mais aminoácidos, sendo que a cadeia pesada também inclui uma região "D" com cerca de 10 ou mais aminoácidos. (Ver, em geral, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2a ed. Raven Press, N.Y., 1989, Cap. 7, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência para todos os efeitos).

[00242] As regiões variáveis maduras de cada par de cadeias leves/pesadas formam o sítio de ligação do anticorpo. Assim, um anticorpo

intacto possui dois sítios de ligação. Exceto em anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois sítios de ligação são iguais. Todas as cadeias exibem a mesma estrutura geral de regiões *framework* (arcabouço) (FR) relativamente conservadas unidas por três regiões hipervariáveis, também chamadas regiões determinantes de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas regiões *framework*, possibilitando a ligação a um epítopo específico. Do N-terminal ao C-terminal, ambas as cadeias leves e pesadas compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A designação de aminoácidos para cada domínio é de acordo com as definições de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 e 1991), ou Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia *et al*., *Nature* 342:878-883 (1989), ou um compósito de Kabat e Chothia, ou IMGT (ImMunoGeneTics information system), AbM ou Contact ou outra definição convencional de CDRs. Kabat também fornece uma convenção amplamente utilizada para numeração (Numeração de Kabat) na qual o mesmo número é designado a resíduos correspondentes entre cadeias pesadas diferentes ou entre cadeias leves diferentes. A menos que de outra evidente pelo contexto, a numeração de Kabat é utilizada para designar a posição de aminoácidos nas regiões variáveis. A menos que de outra evidente pelo contexto, a numeração EU é utilizada para designar posições em regiões constantes.

[00243] Um anticorpo “humanizado” é um anticorpo que retém a reatividade de um anticorpo não humano ao mesmo tempo em que é menos imunogênico nos humanos. Isso pode ser conseguido, por exemplo, retendo as regiões CDR não humanas e substituindo as demais partes do anticorpo por seus equivalentes humanos. Ver, p. ex., Morrison *et al.*, *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison e Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun*., 31(3):169-217 (1994).

[00244] Neste relatório descritivo, o termo “anticorpo quimérico” refere-se a uma molécula de anticorpo na qual (a) a região constante, ou uma porção da mesma, é substituída de modo que o sítio de ligação ao antígeno (região variável, CDR, ou porção da mesma) é ligado a um região constante de uma espécie diferente.

[00245] O termo “epítopo” refere-se a um sítio em um antígeno ao qual se liga um anticorpo. Um epítopo pode ser formado por aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos pelo dobramento terciário de uma ou mais proteínas. Os epítopos formados por aminoácidos contíguos são tipicamente retidos quando da exposição a solventes desnaturantes enquanto que os epítopos formados por dobramento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Tipicamente, um epítopo inclui pelo menos 3 e, mais habitualmente, pelo menos 5 ou 8-10 aminoácidos em uma conformação espacial única. Os métodos para determinação da conformação especial de epítopos incluem, por exemplo, cristalografia de raios-x e ressonância magnética nuclear bidimensional x. Ver, p. ex., *Epitope Mapping Protocols*, em *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[00246] Anticorpos que reconhecem epítopos iguais ou os que se sobrepõem podem ser identificados em um imunoensaio simples mostrando a capacidade de um anticorpo para competir com outro anticorpo pela ligação a um antígeno alvo. O epítopo de um anticorpo pode também ser definidos por cristalografia de raios-x do anticorpo ligado a seu antígeno para identificar resíduos de contato. Alternativamente, dois anticorpos possuem o mesmo epítopo se todas as mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzirem ou eliminarem a ligação do outro. Dois anticorpos possuem epítopos sobrepostos se algumas mutações de aminoácidos que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzirem ou eliminarem a ligação do outro.

[00247] A competição entre anticorpos é determinada por um ensaio no qual um anticorpo em teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum (ver, p. ex., Junghans *et al*., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Um anticorpo em teste compete com um anticorpo de referência se um excesso de um anticorpo em teste (p. ex., pelo menos 2x, 5x, 10x, 20x ou 100x) inibir a ligação do anticorpo de referência em pelo menos 50%, mas preferivelmente 75%, 90% ou 99% conforme medido em um ensaio competitivo de ligação. Os anticorpos identificados pelo ensaio de competição (anticorpos em competição) incluem anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que o anticorpo de referência e anticorpos que se ligam a um epítopo adjacente suficientemente próximo ao epítopo ligado pelo anticorpo de referência para que ocorra impedimento estérico.

[00248] A expressão "liga-se especificamente" refere-se a uma molécula (p. ex., anticorpo ou fragmento de anticorpo) que se liga a um alvo com maior afinidade, avidez, mais rapidamente e/ou com duração maior àquele alvo em uma amostra do que se liga a um composto não alvo. Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga especificamente a um alvo é um anticorpo que se liga ao alvo com afinidade pelo menos 2 vezes maior do que a compostos não alvo, tais como, por exemplo, com afinidade pelo menos 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 50 vezes ou 100 vezes maior. Por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a TIGIT, tipicamente, se ligará a TIGIT com afinidade pelo menos a 2 vezes maior do que a um alvo diferente de TIGIT. Será entendido por qualquer técnico no assunto ao ler essa definição, por exemplo, que um anticorpo (ou porção ou epítopo) que se liga de modo específico ou preferencial a um primeiro alvo pode ou não se ligar de modo específico ou preferencial a um segundo alvo. Assim, "ligação específica" não requer necessariamente (embora possa incluir) ligação exclusiva.

[00249] O termo "afinidade de ligação" é usado como uma medida da

força de uma interação não covalente entre duas moléculas, p. ex., um anticorpo, ou fragmento do mesmo, e um antígeno. O termo "afinidade de ligação" é usado para descrever interações monovalentes (atividade intrínseca).

[00250] A afinidade de ligação entre duas moléculas, p. ex., um anticorpo, ou fragmento do mesmo, e um antígeno, através de uma interação monovalente pode ser quantificada determinando-se a constante de dissociação (K_D). Por sua vez, K_D pode ser determinada medindo-se a cinética de formação e dissociação de um complexo, usando, como um exemplo não limitante, o método da ressonância plasmônica de superfície (SPR) (Biacore™). As constantes da taxa correspondente à associação e à dissociação de um complexo monovalente são referidas como as constantes da taxa de associação k_a (ou k_{on}) e a constante da taxa de dissociação k_d (ou k_{off}), respectivamente. K_D está relacionada a k_a e k_d através da equação $K_D = k_d / k_a$. O valor da constante de dissociação pode ser determinado diretamente por métodos bem conhecidos e pode ser computado mesmo para misturas complexas por métodos tais como aqueles, por exemplo, apresentados em Caceci *et al*. (1984, *Byte* 9: 340-362). Por exemplo, a K_D pode ser estabelecida usando um ensaio de ligação em filtro de nitrocelulose de duplo filtro tal como aquele descrito por Wong & Lohman (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5428-5432). Outros ensaios padrão para avaliar a capacidade para ligação de ligantes, tais como anticorpos para antígenos alvo, são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ELISAs, *Western blots*, RIAs e análise por citometria de fluxo e outros ensaios exemplificados em outro lugar no presente. A cinética de ligação e a afinidade de ligação do anticorpo também podem ser avaliados por ensaios padrão conhecidos na técnica ou como descritos na seção de Exemplos abaixo, tais como Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), p. ex., utilizando um sistema Biacore™; ensaios cinéticos de exclusão tais como KinExA®; e interferometria de

BioLayer (biocamada) (p. ex., usando a plataforma ForteBio® Octet). Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é determinada usando um ensaio de interferometria BioLayer. Ver, p. ex., Wilson *et al*., *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38:400-407 (2010); Dysinger *et al., J. Immunol. Methods*, 379:30-41 (2012); e Estep *et al*., *Mabs*, 2013, 5:270-278.

[00251] O termo "reatividade cruzada", neste relatório descritivo, refere-se à capacidade de um anticorpo ligar-se a um antígeno diferente do antígeno contra o qual o anticorpo foi criado. Em algumas modalidades, reatividade cruzada refere-se à capacidade de um anticorpo ligar-se a um antígeno de uma espécie diferente daquela do antígeno contra o qual o anticorpo foi criado. Como um exemplo não limitante, um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito que é criado contra um antígeno de TIGIT humano pode exibir reatividade cruzada com o TIGIT de uma espécie diferente (p. ex., camundongo ou macaco).

[00252] Um anticorpo "isolado" refere-se a um anticorpo que foi identificado e separado e/ou recuperado de componentes de seu ambiente natural e/ou um anticorpo que é produzido por recombinação. Um "anticorpo purificado" é um anticorpo que é tipicamente pelo menos 50% puro m/m de proteínas interferentes e outros contaminantes resultantes de sua produção ou purificação, mas não exclui a possibilidade de que o anticorpo monoclonal seja combinado com um excesso de veículo(s) farmaceuticamente aceitável(is) ou outro veículo destinado a facilitar seu uso. As proteínas interferentes e outros contaminantes podem incluir, por exemplo, componentes celulares das células das quais um anticorpo é isolado ou produzido por recombinação. Às vezes, os anticorpos monoclonais são pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95 ou 99% puros m/m de proteínas interferentes e contaminantes provenientes da produção ou purificação. Os anticorpos aqui descritos, incluindo anticorpos de rato, quiméricos, *veneered* (com superfície remodelada) e humanizados podem ser providos em forma

isolada e/ou purificada.

[00253] O termo “agente imuno-oncológico” refere-se a um agente que reforça, estimula ou regula positivamente uma resposta imune contra um câncer em um indivíduo (p. ex., estimulando uma resposta imune para inibir o crescimento tumoral). Em algumas modalidades, um agente imuno-oncológico é uma pequena molécula, anticorpo, peptídeo, proteína peptídeo circular, peptidomimético, polinucleotídeo, RNA inibidor, aptâmero, composto medicamentoso ou outro composto. Em algumas modalidades, um agente imuno-oncológico é um antagonista ou inibidor de PD-1 ou da via de PD-1.

[00254] “Sujeito”, “paciente”, “indivíduo” e termos semelhantes são usados alternadamente e referem-se, exceto quando indicado, a mamíferos tais como humanos e primatas não humanos, bem como coelhos, ratos, camundongos, cabras, porcos e outras espécies de mamíferos. O termo não indica necessariamente que o indivíduo foi diagnosticado com uma doença em particular, porém, tipicamente, refere-se a um indivíduo sob supervisão médica.

[00255] Os termos “terapia”, “tratamento” e “melhora” referem-se a qualquer redução na gravidade de sintomas. No caso de tratamento do câncer, tratamento pode referir-se a reduzir, p. ex., tamanho do tumor, número de células cancerosas, velocidade de crescimento, atividade metastática, morte celular de células não cancerosas etc. Neste relatório descritivo, os termos “tratar” e “prevenir” não pretendem ser termos absolutos. Tratamento e prevenção podem referir-se a qualquer demora no surgimento, melhora de sintomas, melhoria na sobrevida do paciente, aumento em tempo ou taxa de sobrevida etc. O tratamento e prevenção podem ser completos (sem sintomas detectáveis restantes) ou parciais, tal que os sintomas são menos frequentes ou graves do que em um paciente sem o tratamento aqui descrito. O efeito do tratamento pode ser em comparação a um indivíduo ou grupo de indivíduos

que recebem o tratamento, ou ao mesmo paciente antes do tratamento ou em um momento diferente durante o tratamento. Em alguns aspectos, a gravidade da doença é reduzida em pelo menos 10%, em comparação, p. ex., ao indivíduo antes da administração ou a um indivíduo controle não submetido ao tratamento. Em alguns aspectos, a gravidade da doença é reduzida em pelo menos 25%, 50%, 75%, 80% ou 90% ou, em alguns casos, não é mais detectável utilizando técnicas diagnósticas padrão.

[00256] Neste relatório descritivo, uma "quantidade terapêutica" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" de um agente (p. ex., um anticorpo como aqui descrito) é uma quantidade do agente que previne, alivia, abate, melhora ou reduz a gravidade de sintomas de uma doença (p. ex., um câncer) em um indivíduo.

[00257] Os termos "administrar", "administrado" ou "administra" referem-se a métodos para a entrega de agentes, compostos ou composições no sítio de ação biológica desejado. Esses métodos incluem, entre outros, liberação tópica, liberação parenteral, liberação intravenosa, liberação intradérmica, liberação intramuscular, liberação colônica, liberação retal ou liberação intraperitoneal. Técnicas de administração que são opcionalmente empregadas com os agentes e métodos aqui descritos incluem, p. ex., as discutidas em Goodman e Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edição corrente; Pergamon; e *Remington's, Pharmaceutical Sciences* (edição corrente), Mack Publishing Co., Easton, PA.

III. Anticorpos contra TIGIT

[00258] Em um aspecto, são providos anticorpos que se ligam a TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM). Tal qual aqui descritos, em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT inibe a interação entre TIGIT e um ou ambos os ligantes CD155 e CD112. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT inibe a interação entre TIGIT e CD155 em um bioensaio funcional, permitindo que ocorra a sinalização CD155-

CD226. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT exibe sinergia com um agente anti-PD-1 (p. ex., um anticorpo anti-PD-1) ou um agente anti-PD-L1 (p. ex., um anticorpo anti-PD-L1).

[00259] Os presentes inventores verificaram que, surpreendentemente, anticorpos anti-TIGIT com função efetora reforçada, tal como pode ser conseguida com anticorpos afucosilado IgG1 afucosilado, depletam células Treg e mostram eficácia melhorada *in vivo*. Consequentemente, em várias modalidades, são providos anticorpos anti-TIGIT afucosilados.

Características exemplares de anticorpos anti-TIGIT

[00260] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT, tal como um anticorpo anti-TIGIT afucosilado, liga-se à proteína TIGIT humano (SEQ ID NO:218) ou uma porção desta com alta afinidade. Em algumas modalidades, o anticorpo tem uma afinidade de ligação (K_D) por TIGIT humano inferior a 5 nM, inferior a 1 nM, inferior a 500 pM, inferior a 250 pM, inferior a 150 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 40 pM, inferior a 30 pM, inferior a 20 pM ou inferior a aproximadamente 10 pM. Em algumas modalidades, o anticorpo tem uma afinidade de ligação (K_D) por TIGIT humano inferior a 50 pM. Em algumas modalidades, o anticorpo tem uma K_D por TIGIT humano na faixa entre aproximadamente 1 pM e 5 nM, p. ex., entre aproximadamente 1 pM e 1 nM, entre aproximadamente 1 pM e 500 pM, entre aproximadamente 5 pM e 250 pM ou entre aproximadamente 10 pM e 100 pM.

[00261] Em algumas modalidades, além de ligar-se a TIGIT humano com alta afinidade, um anticorpo anti-TIGIT afucosilado exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus (“cyno”) (p. ex., uma proteína TIGIT cyno com a sequência de SEQ ID NO:219) e/ou TIGIT de camundongo (p. ex., uma proteína TIGIT de camundongo com a sequência de SEQ ID NO:220). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT liga-se a TIGIT de camundongo (p. ex., um TIGIT de camundongo tendo a sequência

de SEQ ID NO:220) com afinidade de ligação (K_D) igual ou inferior a 100 nM. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT liga-se a TIGIT humano com K_D igual ou inferior a 5 nM ou exibe reatividade cruzada com o TIGIT de camundongo com K_D igual ou inferior a 100 nM. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT que se ligam ao TIGIT humano também exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

[00262] Em algumas modalidades, a reatividade cruzada do anticorpo é determinada pela ligação específica detectada do anticorpo anti-TIGIT a TIGIT que é expresso em uma célula (p. ex., uma linhagem celular que expressa TIGIT humano, TIGIT cyno ou TIGIT de camundongo, ou uma célula primária que expressa endogenamente TIGIT, p. ex., células T primárias que expressam endogenamente TIGIT humano, TIGIT cyno ou TIGIT de camundongo). Em algumas modalidades, a ligação do anticorpo e a reatividade cruzada do anticorpo são determinadas pela ligação específica detectada do anticorpo anti-TIGIT a TIGIT purificado ou recombinante (p. ex., TIGIT humano purificado ou recombinante, TIGIT cyno purificado ou recombinante ou TIGIT de camundongo purificado ou recombinante) ou a uma proteína quimérica compreendendo TIGIT (p. ex., uma proteína de fusão com Fc compreendendo TIGIT humano, TIGIT cyno ou TIGIT de camundongo, ou uma proteína com etiqueta His compreendendo TIGIT humano, TIGIT cyno ou TIGIT de camundongo).

[00263] Métodos para a análise de afinidade de ligação, cinética da ligação e reatividade cruzada são conhecidos na técnica. Ver, p. ex., Ernst *et al.*, *Determination of Equilibrium Dissociation Constants*, *Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley & Sons ed. 2009). Esses métodos incluem, entre outros, ensaios de ligação em fase sólida (p. ex., ensaio ELISA), imunoprecipitação, ressonância plasmônica de superfície (SPR, p. ex., Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), ensaios cinéticos de exclusão (p.

ex., KinExA®), citometria de fluxo, separação de células ativadas por fluorescência (FACS), interferometria BioLayer (p. ex., Octet™ (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)) e análise por *Western blotting*. As técnicas de SPR são revisadas, p. ex., em Hahnfeld *et al. Determination of Kinetic Data Using SPR Biosensors*, *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (2004). Em um experimento típico de SPR, um interatuante (alvo ou agente de direcionamento) é imobilizado em uma lâmina de vidro revestida de ouro SPR-ativa em uma célula de fluxo e uma amostra contendo o outro interatuante é introduzida ao fluxo através da superfície. Quando luz de um dado comprimento de onda é iluminada sobre a superfície, as alterações à refletividade óptica do ouro indica ligação e a cinética de ligação. Em algumas modalidades, ensaios cinéticos de exclusão são usados para determinar a afinidade. Essa técnica é descrita, p. ex., em Darling *et al*., *Assay and Drug Development Technologies* Vol. 2, número 6 647-657 (2004). Em algumas modalidades, usam-se ensaios de interferometria BioLayer para determinar a afinidade. Essa técnica é descrita, p. ex., em Wilson *et al*., *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38:400-407 (2010); Dysinger *et al., J. Immunol. Methods*, 379:30-41 (2012).

[00264] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT aqui providos inibem a interação entre TIGIT e o ligante CD155. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT aqui providos inibem a interação entre TIGIT e o ligante CD112. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT aqui providos inibem a interação entre TIGIT e ambos os ligantes CD155 e CD112.

[00265] Em algumas modalidades, a capacidade de um anticorpo anti-TIGIT para inibir interações entre TIGIT e CD155 e/ou CD112 é avaliada medindo se as interações físicas entre TIGIT e CD155 ou CD112 diminuem em um ensaio de ligação. Em algumas modalidades, o ensaio de ligação é um ensaio competitivo de ligação. O ensaio pode ser realizado em vários

formatos, tais como, entre outros, um ensaio ELISA, citometria de fluxo, um ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR) (p. ex., Biacore™) ou interferometria de BioLayer (p. ex., ForteBio Octet™). Ver, p. ex., Duff *et al*., *Biochem J*., 2009, 419:577-584; Dysinger *et al., J. Immunol. Methods*, 379:30-41 (2012); e Estep *et al*, *Mabs*, 2013, 5:270-278.

[00266] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT inibe a interação entre TIGIT e CD155 em um bioensaio funcional, tal como um ensaio celular funcional no qual a inibição da interação TIGIT/CD155 é avaliada medindo-se a ativação da sinalização de CD155-CD226 na célula (p. ex., através da ativação de um repórter a jusante). Um ensaio celular funcional exemplar é descrito na seção de Exemplos abaixo. Nesse ensaio funcional exemplar, a expressão de luciferase requer o envolvimento de TCR e um sinal coestimulador de CD155-CD226. Uma primeira célula (também referida como "célula T efetora") expressa um complexo TCR, TIGIT e CD226 na superfície da célula e contém um gene luciferase. Uma segunda célula (também referida como "célula apresentadora de antígeno artificial") expressa um ativador de TCR e CD155. A cocultura das células na ausência de anticorpo anti-TIGIT resulta em uma interação TIGIT-CD155 que inibe a coestimulação da célula efetora por CD155-CD226, impedindo a expressão de luciferase pela célula efetora. Na presença de um anticorpo anti-TIGIT que inibe a interação entre TIGIT e CD155, CD155 e CD226 são capazes de interagir e produzem um sinal coestimulador que impulsiona a expressão de luciferase na primeira célula. Tais ensaios celulares funcionais são descritos na técnica, p. ex., Cong *et al*., *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 2015, 35(10):16-17 e estão também disponíveis comercialmente (p. ex., TIGIT/CD155 Blockade Bioassay Kit, Promega Corp., Madison, WI). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT que inibe a interação entre TIGIT e CD155 aumenta o nível ou volume de ativação da sinalização de CD155-CD226 (p. ex., conforme medido em um ensaio celular tal como o kit

TIGIT/CD155 Blockade Bioassay) em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais quando comparado ao nível ou volume da sinalização de CD155-CD226 na ausência do anticorpo anti-TIGIT. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT que inibe a interação entre TIGIT e CD155 aumenta o nível ou volume de ativação da sinalização de CD155-CD226 (p. ex., conforme medido em um ensaio celular tal como o kit TIGIT/CD155 Blockade Bioassay) em pelo menos aproximadamente 1,2 vez, pelo menos aproximadamente 1,5 vez, pelo menos aproximadamente 2 vezes, pelo menos aproximadamente 3 vezes, pelo menos aproximadamente 4 vezes, pelo menos aproximadamente 5 vezes, pelo menos aproximadamente 6 vezes, pelo menos aproximadamente 7 vezes, pelo menos aproximadamente 8 vezes, pelo menos aproximadamente 9 vezes, pelo menos aproximadamente 10 vezes ou mais quando comparado ao nível ou volume da sinalização de CD155-CD226 na ausência do anticorpo anti-TIGIT.

[00267] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT que se ligam ao TIGIT humano (e opcionalmente exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e/ou de camundongo e/ou opcionalmente inibe a interação entre TIGIT e CD155 e/ou CD112) exibe sinergia com um agente anti-PD-1 (p. ex., um anticorpo anti-PD-1). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT reforça o efeito do agente anti-PD-1 (p. ex., anticorpo anti-PD-1) em pelo menos aproximadamente 1,2 vez, pelo menos aproximadamente 1,5 vez, pelo menos aproximadamente 2 vezes, pelo menos aproximadamente 3 vezes, pelo menos aproximadamente 4 vezes, pelo menos aproximadamente 5 vezes, pelo menos aproximadamente 6 vezes, pelo menos aproximadamente 7 vezes, pelo menos aproximadamente 8 vezes, pelo menos aproximadamente 9 vezes, pelo menos aproximadamente 10 vezes ou mais.

[00268] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT exibe sinergia com um agente anti-PD-1 (p. ex., um anticorpo anti-PD-1) em um

bioensaio funcional, tal como um ensaio celular funcional no qual a inibição da sinalização de TIGIT e a inibição da sinalização de PD-1 são avaliadas medindo a ativação da sinalização em uma célula efetora. Um ensaio celular funcional exemplar é descrito na seção de Exemplos abaixo. Nesse ensaio funcional exemplar, uma primeira célula (também referida como "célula T efetora") expressa um complexo de TCR, TIGIT, CD226 e PD-1 na superfície da célula e contém um gene luciferase. Uma segunda célula (também referida como "célula apresentadora de antígeno artificial") expressa um ativador de TCR, CD155 e PD-L1. A expressão do gene luciferase pela célula efetora é ativada por qualquer ou ambos (1) bloqueio da interação TIGIT-CD155, permitindo assim a interação CD155-CD226 e coestimulação subsequente da expressão de luciferase pela célula efetora ou (2) bloqueio da interação PD-1/PD-L1, amenizando, assim, a inibição da expressão de luciferase pela célula efetora. O nível de expressão de luciferase na ausência ou presença de anticorpos anti-TIGIT e agentes anti-PD-1 ou agentes anti-PD-L1 pode ser medido e quantificado para determinar se um anticorpo anti-TIGIT exibe sinergia com o agente anti-PD-1 ou o agente anti-PD-L1. Tais ensaios celulares funcionais são descritos na técnica (p. ex., Cong *et al*., *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 2015, 35(10):16-17) e estão também disponíveis comercialmente (p. ex., PD-1/TIGIT Combination Bioassay Kit, Promega Corp., Madison, WI).

[00269] Em algumas modalidades, a eficácia de um anticorpo anti-TIGIT, bem como se o anticorpo anti-TIGIT inibe sinergicamente com um agente anti-PD-1 (p. ex., um anticorpo anti-PD-1) ou um agente anti-PD-L1 (p. ex., um anticorpo anti-PD-L1), pode ser medida utilizando um modelo *in vivo*, p. ex., um modelo tumoral *in vivo*. Por exemplo, a eficácia de um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito, ou a eficácia de um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito quando administrado em combinação com um agente anti-PD-1 ou um agente anti-PD-L1 pode ser avaliada utilizando um

modelo de tumor singênico em camundongo. Modelos adequados de tumor singênico são descritos na técnica. Ver, p. ex., Rios-Doria *et al*., *Neoplasia*, 2015, 17:661-670; e Moynihan *et al*., *Nature Medicine*, 2016, doi:10.1038/nm.4200. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reduz o tamanho de um tumor ou o número global de tumores em um modelo *in vivo* em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais quando comparado a um valor controle ou de referência (p. ex., quando comparado ao tamanho do tumor ou número global de tumores em um controle não tratado).

[00270] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo de TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos, como numerados com referência a SEQ ID NO:218. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Lys ou Ser na posição 82. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys na posição 82. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Ser na posição 82.

[00271] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo linear que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos (p. ex., um epítopo linear que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo descontínuo que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos (p. ex., um epítopo descontínuo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82).

[00272] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT liga-se a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda uma ou mais (p. ex., 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 ou mais) das posições de aminoácido 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 ou 93. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT liga-se a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda um ou mais (p. ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 ou mais) dos seguintes: Thr na posição 51, Ala na posição 52, Glu ou Gln na posição 53, Val na posição 54, Thr na posição 55, Leu na posição 73, Gly na posição 74, Trp na posição 75, His na posição 76, Val ou Ile na posição 77, Ser ou Pro na posição 79, Asp na posição 83, Arg na posição 84, Val na posição 85, Val ou Ala na posição 86, Pro na posição 87, Gly na posição 88, Pro na posição 89, Ser ou Gly na posição 90, Leu na posição 91, Gly na posição 92 ou Leu na posição 93. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT liga-se a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda um ou mais (p. ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 ou mais) dos resíduos de aminoácidos Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

[00273] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82 e compreende ainda Thr na posição 51, Ala na posição 52, Glu ou Gln na posição 53, Val na posição 54 e/ou Thr na posição 55. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82 e compreende ainda Gly na posição 74, Trp na posição 75, His na posição 76 e/ou Val ou Ile na posição 77. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82 e compreende ainda Pro na posição 87, Gly na posição 88, Pro na posição 89, Ser ou Gly na posição 90, Leu na posição 91, Gly na posição 92 e/ou Leu na posição 93. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo compreendendo os resíduos de aminoácidos Thr51, Ala52, Gln53,

Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

[00274] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82 e compreende ainda Ala na posição 52 e/ou Glu ou Gln na posição 53. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82 e compreende ainda Leu na posição 73, Gly na posição 74 e/ou Trp na posição 75. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo que compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82 e compreende ainda Asp na posição 83, Arg na posição 84, Val na posição 85 e/ou Val ou Ala na posição 86. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo compreendendo os resíduos de aminoácidos Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 e Ala86.

[00275] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo de TIGIT humano compreendendo a sequência ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO:258), que corresponde aos resíduos 68-82 de TIGIT humano (SEQ ID NO:218). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT reconhece um epítopo de TIGIT humano que consiste na sequência ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO:258).

Certas sequências do anticorpo anti-TIGIT

[00276] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT que se ligam ao TIGIT humano e que exibe opcionalmente reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo compreende uma sequência da região variável da cadeia leve, ou uma porção da mesma, e/ou uma sequência da região variável da cadeia pesada, ou uma porção da mesma, derivada de qualquer um dos anticorpos seguintes aqui descritos: Clone 2, Clone 2C, Clone 3, Clone 5, Clone 13, Clone 13A, Clone 13B,

Clone 13C, Clone 13D, Clone 14, Clone 16, Clone 16C, Clone 16D, Clone 16E, Clone 18, Clone 21, Clone 22, Clone 25, Clone 25A, Clone 25B, Clone 25C, Clone 25D, Clone 25E, Clone 27 ou Clone 54. As sequências de aminoácidos da CDR, do domínio variável da cadeia leve (VL) e do domínio variável da cadeia pesada (VH) dos anticorpos anti-TIGIT Clone 2, Clone 2C, Clone 3, Clone 5, Clone 13, Clone 13A, Clone 13B, Clone 13C, Clone 13D, Clone 14, Clone 16, Clone 16C, Clone 16D, Clone 16E, Clone 18, Clone 21, Clone 22, Clone 25, Clone 25A, Clone 25B, Clone 25C, Clone 25D, Clone 25E, Clone 27 e Clone 54 são apresentadas na Tabela de sequências abaixo.

[00277] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257. Em algumas modalidades, uma sequência de VH tendo pelo menos

90% de identidade de sequência com uma sequência de referência (p. ex., SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257) contém uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições (p. ex., substituições conservadoras), inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas retém a capacidade para se ligar a TIGIT humano e, opcionalmente, retém a capacidade para bloquear a ligação de CD155 e/ou CD112 a TIGIT.

[00278] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208. Em algumas modalidades, uma sequência de VL tendo pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de referência (p. ex., SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ

ID NO:190 ou SEQ ID NO:208) contém uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições (p. ex., substituições conservadoras), inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas retém a capacidade para se ligar a TIGIT humano e, opcionalmente, retém a capacidade para bloquear a ligação de CD155 e/ou CD112 to TIGIT.

[00279] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e compreende ainda uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID

NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e compreende ainda uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208.

[00280] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende:

(a) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:10;

(b) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:19 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:28;

(c) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:37 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:46;

(d) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:64;

(e) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:73 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:82;

(f) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:100;

(g) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:109 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:118;

(h) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:127 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:136;

(i) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos

com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:145 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:154;

(j) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:172;

(k) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:181 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:190; ou

(l) uma VH compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) to SEQ ID NO:199 e uma VL compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com SEQ ID NO:208.

[00281] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende:

(a) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10;

(b) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28;

(c) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46;

(d) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(e) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82;

(f) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:91 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100;

(g) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:118;

(h) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:127 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:136;

(i) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:145 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:154;

(j) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:163 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172;

(k) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:181 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:190;

(l) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:199 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:208; ou

(m) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:245 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; ou

(n) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:246 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; ou

(o) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:247 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; ou

(p) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:248 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO:64;

(q) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:249 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; ou

(r) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:250 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(s) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:251 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(t) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:252 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(u) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:253 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(v) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:254 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(w) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:255 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(x) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:256 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(y) uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:257 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172.

[00282] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT

compreende CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve, em que uma ou mais (p. ex., uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) das CDRs são selecionadas dentre as CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e as CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve mostradas nas Tabelas A, B, C, D e E.

Tabela A: Definições de CDRs alternativas para o Clone 13

Definição de CDR	CDR1 de cadeia pesada (HC)	SEQ ID NO	CDR2 DE HC	SEQ ID NO	CDR3 DE HC	SEQ ID NO
Compósito	GTFSSYAIS	58	SIIPIFGTANYAQKFQG	60	ARGPSEVGAILGYVWFDP	62
IMGT	GGTFSSYA	283	IIPIFGTA	285	ARGPSEVGAILGYVWFDP	62
Kabat	SYAIS	284	SIIPIFGTANYAQKFQG	60	GPSEVGAILGYVWFDP	286
Definição de CDR	CDR1 de cadeia leve (LC)	SEQ ID NO	CDR2 DE LC	SEQ ID NO	CDR3 DE LC	SEQ ID NO
Compósito	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71
IMGT	QSLLHSNGYNY	287	LGS	288	MQARRIPIT	71
Kabat	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71

Tabela B: Definições de CDRs alternativas para o Clone 13A

Definição de CDR	CDR1 de cadeia pesada (HC)	SEQ ID NO	CDR2 DE HC	SEQ ID NO	CDR3 DE HC	SEQ ID NO
Compósito	GTFLSSAIS	224	SLIPYFGTANYAQKFQG	225	ARGPSEVGAILGYVWFDP	62
IMGT	GGTFLSSA	293	LIPYFGTA	297	ARGPSEVGAILGYVWFDP	62
Kabat	SSAIS	294	SLIPYFGTANYAQKFQG	225	GPSEVGAILGYVWFDP	286
Definição de CDR	CDR1 de cadeia leve (LC)	SEQ ID NO	CDR2 DE LC	SEQ ID NO	CDR3 DE LC	SEQ ID NO
Compósito	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71
IMGT	QSLLHSNGYNY	287	LGS	288	MQARRIPIT	71
Kabat	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71

Tabela C: Definições de CDRs alternativas para o Clone 13B

Definição de CDR	CDR1 de cadeia pesada (HC)	SEQ ID NO	CDR2 DE HC	SEQ ID NO	CDR3 DE HC	SEQ ID NO
Compósito	GTFSAWAIS	226	SIIPYFGKANYAQKFQG	227	ARGPSEVSGILGYVWFDP	228
IMGT	GGTFSAWA	289	IIPYFGKA	291	ARGPSEVSGILGYVWFDP	228
Kabat	AWAIS	290	SIIPYFGKANYAQKFQG	227	GPSEVSGILGYVWFDP	292
Definição de CDR	CDR1 de cadeia leve (LC)	SEQ ID NO	CDR2 DE LC	SEQ ID NO	CDR3 DE LC	SEQ ID NO
Compósito	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71
IMGT	QSLLHSNGYNY	287	LGS	288	MQARRIPIT	71

Definição de CDR	CDR1 de cadeia pesada (HC)	SEQ ID NO	CDR2 DE HC	SEQ ID NO	CDR3 DE HC	SEQ ID NO
Kabat	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71

Tabela D: Definições de CDRs alternativas para o Clone 13C

Definição de CDR	CDR1 de cadeia pesada (HC)	SEQ ID NO	CDR2 DE HC	SEQ ID NO	CDR3 DE HC	SEQ ID NO
Compósito	GTFLSSAIS	224	SIIPLFGKANYAQKFQG	229	ARGPSEVKGILGYVWFDP	230
IMGT	GGTFLSSA	293	IIPLFGKA	295	ARGPSEVKGILGYVWFDP	230
Kabat	SSAIS	294	SIIPLFGKANYAQKFQG	229	GPSEVKGILGYVWFDP	296
Definição de CDR	CDR1 de cadeia leve (LC)	SEQ ID NO	CDR2 DE LC	SEQ ID NO	CDR3 DE LC	SEQ ID NO
Compósito	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71
IMGT	QSLLHSNGYNY	287	LGS	288	MQARRIPIT	71
Kabat	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71

Tabela E: Definições de CDRs alternativas para o Clone 13D

Definição de CDR	CDR1 de cadeia pesada (HC)	SEQ ID NO	CDR2 DE HC	SEQ ID NO	CDR3 DE HC	SEQ ID NO
Compósito	GTFLSSAIS	224	SIIPYFGKANYAQKFQG	227	ARGPSEVKGILGYVWFDP	230
IMGT	GGTFLSSA	293	IIPYFGKA	290	ARGPSEVKGILGYVWFDP	230
Kabat	SSAIS	294	SIIPYFGKANYAQKFQG	227	GPSEVKGILGYVWFDP	296
Definição de CDR	CDR1 de cadeia leve (LC)	SEQ ID NO	CDR2 DE LC	SEQ ID NO	CDR3 DE LC	SEQ ID NO
Compósito	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71
IMGT	QSLLHSNGYNY	287	LGS	288	MQARRIPIT	71
Kabat	RSSQSLLHSNGYNYLD	67	LGSNRAS	69	MQARRIPIT	71

[00283] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma ou mais (p. ex., uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) de:

uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 e SEQ ID NO:295;

uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 e SEQ ID NO:296;

uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:67 e SEQ ID NO:287;

uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:69 e SEQ ID NO:288; e/ou

uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00284] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 ou SEQ ID NO:290; uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 ou SEQ ID NO:295; uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 ou SEQ ID NO:296; uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:69 ou SEQ ID NO:288; e uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00285] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 ou SEQ ID NO:290; uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 ou SEQ ID NO:295; e uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 ou SEQ ID NO:296.

[00286] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:69 ou SEQ ID NO:288; e uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00287] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283 ou SEQ ID NO:284; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:60 ou SEQ ID NO:285; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62 ou SEQ ID NO:286; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69 ou SEQ ID

NO:288; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00288] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293 ou SEQ ID NO:294; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:225 ou SEQ ID NO:297; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62 ou SEQ ID NO:286; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69 ou SEQ ID NO:288; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00289] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 ou SEQ ID NO:290; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:227 ou SEQ ID NO:291; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:228 ou SEQ ID NO:292; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69 ou SEQ ID NO:288; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00290] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293 ou SEQ ID

NO:294; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:229 ou SEQ ID NO:295; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:230 ou SEQ ID NO:296; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69 ou SEQ ID NO:288; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00291] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293 ou SEQ ID NO:294; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:227 ou SEQ ID NO:290; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:230 ou SEQ ID NO:296; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67 ou SEQ ID NO:287; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69 ou SEQ ID NO:288; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00292] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma ou mais (p. ex., uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) dentre:

uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID

NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 ou SEQ ID NO:290;

uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 ou SEQ ID NO:295;

uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 ou SEQ ID NO:296;

uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 ou SEQ ID NO:287;

uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 ou SEQ ID NO:288; e/ou

uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 ou SEQ ID NO:215.

[00293] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 ou SEQ ID NO:290; uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 ou SEQ ID NO:295; e uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 ou SEQ ID NO:296.

[00294] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 ou SEQ ID NO:287; uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 ou SEQ ID NO:288; e uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 ou SEQ ID NO:215.

[00295] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende:

(i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 ou SEQ ID NO:290; e

(ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ

ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 ou SEQ ID NO:295; e

(iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 ou SEQ ID NO:296; e

(iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 ou SEQ ID NO:287; e

(v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 ou SEQ ID NO:288; e

(vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 ou SEQ ID NO:215.

[00296] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:221; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:222; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:223; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:17.

[00297] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:224 ou SEQ ID NO:226; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227 ou SEQ ID NO:229; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:228 ou SEQ ID NO:230; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:67; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:69; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

[00298] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:231 ou SEQ ID NO:233; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:232 ou SEQ ID NO:234; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer

uma dentre SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236 ou SEQ ID NO:237; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:103; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:105; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:107.

[00299] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende: (i) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:239 ou SEQ ID NO:243; (ii) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:238 ou SEQ ID NO:240; (iii) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 ou SEQ ID NO:244; (iv) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:175; (v) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:177; e (vi) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:179.

[00300] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma CDR1 da cadeia pesada-3 e uma CDR1 da cadeia leve-3 compreendendo as sequências de aminoácidos de:

(a) SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 13, 15 e 17, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 22, 24, 26, 31, 33 e 35, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 40, 42, 44, 49, 51 e 53, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente;

(e) SEQ ID NOs: 76, 78, 80, 85, 87 e 89, respectivamente;

(f) SEQ ID NOs: 94, 96, 98, 103, 105 e 107, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs: 112, 114, 116, 121, 123 e 125,

respectivamente;

(h) SEQ ID NOs: 130, 132, 134, 139, 141 e 143, respectivamente;

(i) SEQ ID NOs: 148, 150, 152, 157, 159 e 161, respectivamente;

(j) SEQ ID NOs: 166, 168, 170, 175, 177 e 179, respectivamente;

(k) SEQ ID NOs: 184, 186, 188, 193, 195 e 197, respectivamente;

(l) SEQ ID NOs: 202, 204, 206, 211, 213 e 215, respectivamente; ou

(m) SEQ ID NOs: 221, 222, 223, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(n) SEQ ID NOs: 224, 225, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(o) SEQ ID NOs: 226, 227, 228, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(p) SEQ ID NOs: 224, 229, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(q) SEQ ID NOs: 224, 227, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(r) SEQ ID NOs: 231, 232, 235, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(s) SEQ ID NOs: 233, 234, 236, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(t) SEQ ID NOs: 233, 234, 237, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(u) SEQ ID NOs: 166, 238, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(v) SEQ ID NOs: 239, 240, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(w) SEQ ID NOs: 239, 240, 241, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(x) SEQ ID NOs: 239, 240, 242, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(y) SEQ ID NOs: 243, 168, 244, 175, 177 e 179, respectivamente.

[00301] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma ou mais regiões *framework* da cadeia pesada (FR1, FR2, FR3 e/ou FR4) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:205 ou SEQ ID NO:207.

[00302] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma ou mais regiões *framework* da cadeia leves (FR1, FR2, FR3 e/ou FR4) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID

NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:214 ou SEQ ID NO:216.

[00303] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

[00304] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT da presente invenção não competem pela ligação com os anticorpos descritos em US 2009/0258013, US 2016/0176963, US 2016/0376365 ou WO 2016/028656. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT da presente invenção não se ligam ao mesmo epítopo que os anticorpos descritos em US 2009/0258013, US 2016/0176963, US 2016/0376365 ou WO 2016/028656.

Preparação de anticorpos

[00305] Para preparar um anticorpo que se liga a TIGIT, podem ser utilizadas muitas técnicas conhecidas no campo. Ver, p. ex., Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); e Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed. 1986)).

[00306] Os genes que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo de interesse podem ser clonados de uma célula, p. ex., os genes que codificam um anticorpo monoclonal podem ser clonados de um hibridoma que expressa o anticorpo e utilizados para produzir um anticorpo monoclonal recombinante. É possível também criar bibliotecas de genes que codificam cadeias pesadas e leves de anticorpos monoclonais a partir de células de hibridoma ou do plasma. Além disso, pode-se utilizar a tecnologia de expressão em fagos ou leveduras para identificar anticorpos e fragmentos Fab heteroméricos que se ligam especificamente aos antígenos selecionados (ver, p. ex., McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992); Lou *et al.* (2010) *PEDS* 23:311; e Chao *et al., Nature Protocols*, 1:755-768 (2006)). Alternativamente, anticorpos e sequências de anticorpos podem ser isolados e/ou identificados utilizando um sistema de apresentação de anticorpos baseado em leveduras, tal como aquele descrito em, p. ex., Xu *et al*., *Protein Eng Des Sel*, 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256; e WO 2012/009568. Combinações aleatórias dos produtos gênicos da cadeia pesada e leve geram um grande agrupamento de anticorpos com especificidade antigênica diferente (ver, p. ex., Kuby, *Immunology* (3ª ed. 1997)). Técnicas para a produção de anticorpos de cadeia única ou anticorpos recombinantes (Patente dos E.U.A. 4 946 778, Patente dos E.U.A. Nº 4 816 567) também podem ser adaptadas para produzir anticorpos. Os anticorpos também ser feitos biespecíficos, ou seja, capazes de reconhecer dois antígenos diferentes (ver, p. ex., WO 93/08829, Traunecker *et al., EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); e Suresh *et al., Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Os anticorpos podem também ser heteroconjugados, p. ex., dois anticorpos unidos covalentemente, ou anticorpos ligados covalentemente a imunotoxinas (ver, p. ex., Patente dos E.U.A. Nº 4 676 980, WO 91/00360; e WO 92/200373).

[00307] Os anticorpos podem ser produzidos utilizando diversos

sistemas de expressão, incluindo sistemas de expressão procariótica e eucariótica. Em algumas modalidades, o sistema de expressão é uma célula de mamífero, tal como um hibridoma ou uma célula CHO. Muitos de tais sistemas estão amplamente disponíveis em fornecedores comerciais. Em modalidades nas quais um anticorpo compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas utilizando um único vetor, p. ex., em uma unidade de expressão discistrônica, ou estarem sob o controle de promotores diferentes. Em outras modalidades, uma região da cadeia pesada e da cadeia leve podem ser expressas usando vetores separados. As cadeias pesadas e cadeias leves aqui descritas podem compreender opcionalmente uma metionina no N-terminal.

[00308] Em algumas modalidades, são gerados fragmentos de anticorpos (tais como Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv ou diabody). Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados por intermédio da digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, p. ex., Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). No entanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente utilizando células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, fragmentos de anticorpos podem ser isolados de bibliotecas de anticorpos em fagos. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de células de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (ver, p. ex., Carter *et al.*, *BioTechnology*, 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, $F(ab')_2$ fragmentos podem ser isolados diretamente de cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os competentes no assunto. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Ver, p. ex., a Publicação PCT Nº WO 93/16185; e Patentes dos E.U.A. Nºs 5 571 894 e 5 587 458. O fragmento de

anticorpo pode ser também um anticorpo linear como descrito, p. ex., na Patente dos E.U.A. Nº 5 641 870.

[00309] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser conjugado a outra molécula, p. ex., polietilenoglicol (PEGuilação) ou albumina sérica, para prolongar a meia-vida *in vivo*. Exemplos da PEGuilação de fragmentos de anticorpos são fornecidos em Knight *et al. Platelets* 15:409, 2004 (para abciximabe); Pedley *et al*., *Br. J. Cancer* 70:1126, 1994 (para um anticorpo anti-CEA); Chapman *et al*., *Nature Biotech*. 17:780, 1999; e Humphreys, *et al., Protein Eng. Des*. 20: 227, 2007.

[00310] Em algumas modalidades, são providos anticorpos multiespecíficos que compreendem um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito, p. ex., um anticorpo biespecífico. Anticorpos multiespecíficos são anticorpos com especificidades de ligação por pelo menos dois sítios diferentes. Em algumas modalidades, o anticorpo multiespecífico possui uma especificidade de ligação por TIGIT (p. ex., TIGIT humano) e possui uma especificidade de ligação por pelo menos outro antígeno. Métodos para a produção de anticorpos multiespecíficos incluem, entre outros, coexpressão recombinante de dois pares de cadeia pesada e cadeia leve em uma célula hospedeira (ver, p. ex., Zuo *et al*., *Protein Eng Des Sel*, 2000, 13:361-367); engenharia do tipo "*knobs-into-holes*" (protuberância em buracos) (ver, p. ex., Ridgway *et al*., *Protein Eng Des Sel*, 1996, 9:617-721); tecnologia de "diabody" (ver, p. ex., Hollinger *et al*., *PNAS (USA)*, 1993, 90:6444-6448); e trimerização intramolecular (ver, p. ex., Alvarez-Cienfuegos *et al*., *Scientific Reports*, 2016, doi:/10.1038/srep28643); Ver também, Spiess *et al*., *Molecular Immunology*, 2015, 67(2), Part A:95-106.

[00311] Em algumas modalidades, são providos conjugados anticorpo-fármaco compreendendo um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito. Nos conjugados anticorpo-fármaco, um anticorpo monoclonal com uma especificidade de ligação por um antígeno (p. ex., TIGIT) é ligado

covalentemente a um fármaco citotóxico. Métodos para a produção de conjugados anticorpo-fármaco são descritos, p. ex., em Chudasama *et al*., *Nature Chemistry*, 2016, 8:114-119; WO 2013/068874; e US 8,535,678.

Seleção de região constante

[00312] Regiões variáveis da cadeia pesada e da leve dos anticorpos anti-TIGIT aqui descritos podem ser ligadas a pelo menos uma porção de uma região constante humana. A escolha da região constante depende, em parte, se forem desejadas citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo, fagocitose celular dependente de anticorpo e/ou citotoxicidade dependente do complemento. Por exemplo, os isótipos IgG1 e IgG3 humanos possuem forte citotoxicidade dependente do complemento, o isótipo IgG2 humano exibe fraca citotoxicidade dependente do complemento e IgG4 humana é desprovida de citotoxicidade dependente do complemento. IgG1 e IgG3 humanas também induzem funções efetoras mais fortes mediadas por células do que IgG2 e IgG4 humanas. As regiões constantes da cadeia leve podem ser lambda ou kappa. Anticorpos podem ser expressos como tetrâmeros contendo duas cadeias leves e duas pesadas, como cadeias pesadas e cadeias leves separadas, como Fab, Fab', $F(ab')_2$ e Fv ou como anticorpos de cadeia única nos quais domínios variáveis de cadeia pesada e leve são ligados através de um espaçador.

[00313] As regiões constantes humanas mostram variação alotípica e variação isoalotípica entre indivíduos diferentes, ou seja, as regiões constantes podem diferir em indivíduos diferentes em uma ou mais posições polimórficas. Isoalotipos diferem de alótipos pelo fato de que o soro que reconhece um isoalotipo se liga a uma região não polimórfica de um ou mais outros isótipos.

[00314] Um ou diversos aminoácidos na terminação amino ou carboxi da cadeia leve e/ou pesada, tal como a lisina C-terminal da cadeia pesada, podem estar ausentes ou serem derivados em uma proporção ou todas as

moléculas. Podem ser feitas substituições nas regiões constantes para reduzir ou aumentar a função efetora, tal como a citotoxicidade mediada pelo complemento ou ADCC (ver, p. ex., Winter *et al*., Patente dos E.U.A. Nº 5 624 821; Tso *et al*., Patente dos E.U.A. Nº 5 834 597; e Lazar *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), ou para prolongar a meia-vida em humanos (ver, p. ex., Hinton *et al*., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

[00315] As substituições exemplares incluem a substituição de aminoácido do aminoácido nativo por um resíduo de cisteína que é introduzido na posição de aminoácido 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330, ou 332, de preferência uma mutação S239C em um isótipo IgG1 humano (a numeração é de acordo com o índice EU (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 e 1991); ver US 20100158909, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência). A presença de um resíduo adicional de cisteína pode permitir a formação de ligação dissulfeto intra-cadeia. Tal formação de ligação dissulfeto intra-cadeia pode causar impedimento estérico, reduzindo, assim, a afinidade de ligação por interação região Fc-FcγR. O(s) resíduo(s) cisteína introduzido(s) na proximidade ou na região Fc da região constante de uma IgG pode também servir como sítios para conjugação a agentes terapêuticos (ou seja, o acoplamento de fármacos citotóxicos usando reagentes específicos com tiol tais como derivados maleimida de fármacos. A presença de um agente terapêutico causa impedimento estérico, com isso, reduzindo mais a afinidade de ligação por interação região Fc-FcγR. Outras substituições em qualquer uma das posições 234, 235, 236 e/ou 237 reduzem a afinidade por receptores Fcγ, especialmente o receptor FcγRI (ver, p. ex., US 6 624 821, US 5 624 821). Uma combinação preferida de mutações é S239D, A330L e I332E, que aumenta a afinidade do domínio Fc por FcγRIIIA e, consequentemente, aumenta ADCC.

[00316] A meia-vida *in vivo* de um anticorpo pode também ter impacto

sobre suas funções efetoras. A meia-vida de um anticorpo pode ser aumentada ou diminuída para modificar suas atividades terapêuticas. FcRn é um receptor estruturalmente semelhante ao antígeno do MHC Classe I que se associa não covalentemente com β2-microglobulina. FcRn regula o catabolismo de IgGs e a transcitose delas através de tecidos (Ghetie e Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie e Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). A interação IgG-FcRn ocorre em pH 6,0 (pH de vesículas intracelulares), mas não em pH 7,4 (pH do sangue); essa interação permite que IgGs sejam recicladas de volta para a circulação (Ghetie e Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie e Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). A região em IgG1 humana envolvida na ligação com FcRn foi mapeada (Shields *et al.,* 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Substituições de alanina nas posições Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 ou Asn434 de IgG1 humana reforça a ligação com FcRn (Shields *et al.,* 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Moléculas de IgG1 que abrigam essas substituições exibem meias-vidas mais longas no soro. Consequentemente, essas moléculas modificadas de IgG1 podem ser capazes de conduzir as suas funções efetoras e, portanto, exercer as suas eficácias terapêuticas durante um período mais de tempo em comparação a IgG1 não modificada. Outras substituições exemplares para aumentar a ligação a FcRn incluem Gln na posição 250 e/ou Leu na posição 428. A numeração EU é usada para todas as posições na região constante.

[00317] Oligossacarídeos ligados covalentemente ao Asn297 conservado estão envolvidos na capacidade da região Fc de uma IgG para ligar-se a FcγR (Lund *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 157:4963-69; Wright e Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.* 15:26-31). A engenharia dessa glicoforma em IgG pode melhorar significativamente ADCC mediada por IgG. A adição de modificações que bifurcam N-acetilglicosamina (Umana *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotech. Bioeng.*

74:288-94) a essa glicoforma ou a remoção de fucose (Shields *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40; Shinkawa *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604; Niwa *et al.*, 2004, *Cancer Res.* 64:2127-33) dessa glicoforma são dois exemplos de engenharia em Fc da IgG que melhora a ligação entre Fc da IgG e FcγR, reforçando, assim, a atividade ADCC mediada por Ig.

[00318] Uma substituição sistêmica de aminoácidos expostos ao solvente da região Fc de IgG1 humana gerou variantes de IgG com afinidades de ligação ao FcγR alteradas (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Quando comparado à IgG1 original, um subconjunto dessas variantes envolvendo substituições em Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334, ou Ser298/Glu333/Lys334 para Ala demonstram aumentar tanto a afinidade de ligação a FcγR como a atividade ADCC (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49).

[00319] A atividade de anticorpos de fixação do complemento (tanto ligação a C1q como atividade CDC) pode ser melhoradas por substituições em Lys326 e Glu333 (Idusogie *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-2575). As mesmas substituições na cadeia principal (*backbone*) de IgG2 humana pode converter o isótipo de um anticorpo que se liga pouco a C1q e é gravemente deficiente na atividade de ativação do complemento para um que pode se ligar a C1q e mediar CDC (Idusogie *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-75). Diversos outros métodos foram também aplicados para melhorar a atividade de fixação do complemento de anticorpos. Por exemplo, o enxerto de um pedaço na cauda com 18 aminoácidos do terminal carboxila de IgM às terminações carboxila de IgGs reforça em grande medida a sua atividade CDC. Isso é observado mesmo com IgG4, que normalmente não tem atividade CDC detectável (Smith *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:2226-36). Além disso, a substituição de Ser444 localizada próxima ao terminal carbóxi da cadeia pesada de IgG1 por Cys induziu dimerização cauda a cauda de IgG1 com 200 vezes de aumento da atividade CDC em relação à IgG1 monomérica

(Shopes *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22). Além disso, uma construção de diabody biespecífico com especificidade por C1q também confere atividade CDC (Kontermann *et al.*, 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

[00320] A atividade no complemento pode ser reduzida por mutação em pelo menos um dos resíduos de aminoácidos 318, 320 e 322 da cadeia pesada para um resíduo com uma cadeia lateral diferente, tal como Ala. Outros resíduos não iônicos substituídos com alquila, tais como Gly, Ile, Leu ou Val, ou resíduos aromáticos não polares tais como Phe, Tyr, Trp e Pro no lugar de qualquer um dos três resíduos também reduz ou abole a ligação a C1q. Ser, Thr, Cys e Met podem ser utilizados nos resíduos 320 e 322, mas não 318, para reduzir ou abolir a atividade de ligação a C1q. A substituição do resíduo 318 (Glu) por um resíduo polar pode modificar, mas não abolir a atividade de ligação a C1q. A substituição do resíduo 297 (Asn) por Ala resulta em remoção da atividade lítica, mas reduz a afinidade apenas levemente (aproximadamente três vezes mais fraca) por C1q. Essa alteração destrói a glicosilação e a presença de carboidrato que é necessária para a ativação do complemento. Qualquer outra substituição nesse sítio também destrói o sítio de glicosilação. As mutações seguintes e qualquer combinação das mesmas também reduz a ligação a C1q: D270A, K322A, P329A e P311S (ver WO 06/036291).

[00321] A referência a uma região constante humana inclui uma região constante com qualquer alotipo natural ou qualquer permutação de resíduos que ocupem posições polimórficas em alótipos naturais. Além disso, até 1, 2, 5 ou 10 mutações podem estar presentes em relação a uma região constante humana natural, tal como aquelas indicadas acima para reduzir a ligação ao receptor Fcγ ou aumentar a ligação a FcRN.

Ácidos nucleicos, vetores e células hospedeiras

[00322] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-TIGIT como aqui descritos são preparados usando métodos recombinantes. Dessa forma, em

alguns aspectos, a invenção provê ácidos nucleicos isolados que compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer um dos anticorpos anti-TIGIT aqui descritos (p. ex., qualquer uma ou mais das CDRs aqui descritas); vetores compreendendo tais ácidos nucleicos; e células hospedeiras nas quais os ácidos nucleicos são introduzidos que são usadas para replicar os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos e/ou para expressar os anticorpos. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é eucariótica, p. ex., uma célula de ovário de hamster chinês (CHO); ou uma célula humana.

[00323] Em algumas modalidades, um polinucleotídeo (p. ex., um polinucleotídeo isolado) compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo aqui descrito. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma ou mais sequências de aminoácidos (p. ex., CDR, cadeia pesada, cadeia leve e/ou regiões *framework*) descritas na Tabela de sequências. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85% de identidade de sequência (p. ex., pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência) com uma sequência (p. ex., uma sequência de CDR, cadeia pesada, cadeia leve ou região *framework*) descritas na Tabela de sequências abaixo.

[00324] Em algumas modalidades, um polinucleotídeo (p. ex., um polinucleotídeo isolado) compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável da cadeia pesada aqui descrita. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência

com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos com pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:269 ou SEQ ID NO:271.

[00325] Em algumas modalidades, um polinucleotídeo (p. ex., um polinucleotídeo isolado) compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável da cadeia leve aqui descrita. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos com pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:209 ou SEQ ID NO: 273.

[00326] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma

sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve como aqui descritas. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e que codifica uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos com pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:269 ou SEQ ID NO:271 e compreende ainda uma sequência de nucleotídeos com pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:209 ou SEQ ID NO: 273.

[00327] Em um aspecto adicional, são providos métodos para a produção de um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito. Em algumas modalidades, o método inclui cultivar uma célula hospedeira como aqui descrita (p. ex., uma célula hospedeira que expressa um polinucleotídeo ou vetor como aqui descrito) sob condições adequadas para a expressão do anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo é subsequentemente recuperado da célula hospedeira (ou meio de cultura de células hospedeiras).

[00328] Vetores adequados contendo polinucleotídeos que codificam anticorpos da presente invenção, ou fragmentos dos mesmos, incluem vetores de clonagem e vetores de expressão. Embora o vetor de clonagem possa variar de acordo com a célula hospedeira que se pretende usar, os vetores de clonagem úteis em geral são capazes de auto-replicação, podem possuir um alvo único para uma endonuclease de restrição em particular e/ou podem carregar genes para um marcador que pode ser utilizado para selecionar clones contendo o vetor. Os exemplos incluem plasmídeos, vírus e bactérias, p. ex., pUC18, pUC19, Bluescript (p. ex., pBS SK+) e seus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, DNAs fágicos e vetores condutores (*shuttle*) tais como pSA3 e pAT28. Vetores de clonagem são disponibilizados por fornecedores comerciais tais como BioRad, Stratagene e Invitrogen.

[00329] Os vetores de expressão são em geral construções de polinucleotídeos replicáveis que contêm um ácido nucleico da presente invenção. O vetor de expressão pode replicar nas células hospedeiras quer como episssomas ou como parte integrante do DNA cromossômico. Os vetores de expressão adequados incluem, entre outros, plasmídeos, vetores virais, incluindo adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus e qualquer outro vetor.

Expressão de anticorpos recombinantes

[00330] Anticorpos são tipicamente produzidos por expressão

recombinante. Construções de polinucleotídeos recombinantes incluem tipicamente uma sequência de controle da expressão ligada operacionalmente às sequências de codificação de cadeias do anticorpo, incluindo regiões promotoras associadas naturalmente ou heterólogas. De preferência, as sequências de controle da expressão são sistemas de promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas. Uma vez o vetor tenha sido incorporado no hospedeiro adequado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão de alto nível das sequências de nucleotídeos e a coleta e purificação dos anticorpos com reatividade cruzada.

[00331] Células de mamíferos são um hospedeiro preferido para a expressão de segmentos nucleotídicos que codificam imunoglobulinas ou fragmentos das mesmas. Ver Winnacker*, From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Diversas linhagens de células hospedeiras adequadas, capazes de secretar proteínas heterólogas intactas, foram desenvolvidas na técnicas e incluem linhagens de células CHO (p. ex., DG44), várias linhagens de células COS, células HeLa, células HEK293, células L e de mielomas não produtores de anticorpos incluindo Sp2/0 e NS0. De preferência, as células não são humanas. Os vetores de expressão para essas células podem incluir sequências de controle da expressão, tal como uma origem de replicação, um promotor, um reforçador (*enhancer*) (Queen *et al*., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) e sítios necessários para o processamento de informações, tais como sítios de ligação ao ribossomo, sítios de *splicing* do RNA, sítios de poliadenilação e sequências terminadoras da transcrição. As sequências preferidas para o controle da expressão são promotores derivados de genes endógenos, do citomegalovírus, SV40, adenovírus, papilomavírus bovino e similares. Ver Co *et al*., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[00332] Uma vez expressos, os anticorpos podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão da técnica, incluindo purificação por

HPLC, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e similares (ver de modo geral, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Variantes de glicosilação

[00333] Os anticorpos podem ser glicosilados em posições conservadas nas suas regiões constantes (Jefferis e Lund, (1997) *Chem. Immunol*. 65:111-128; Wright e Morrison, (1997) *TibTECH* 15:26-32). As cadeias laterais de oligossacarídeos das imunoglobulinas afetam a função da proteína (Boyd *et al.,* (1996) *Mol. Immunol*. 32:1311-1318; Wittwe e Howard, (1990) *Biochem.* 29:4175-4180) e a interação intramolecular entre porções da glicoproteína que podem afetar a conformação e a superfície tridimensional apresentada da glicoproteína (Hefferis e Lund, *supra*; Wyss e Wagner, (1996) *Current Opin. Biotech*. 7:409-416). Oligossacarídeos podem também servir no direcionamento de uma dada glicoproteína para certas moléculas com base em estruturas de reconhecimento específico. Por exemplo, foi relatado que em IgG agalactosilada, a porção oligossacarídeo "vira" para fora do espaço inter-CH2 e resíduos da N-acetilglicosamina terminal tornam-se disponíveis para ligar manose à proteína de ligação (Malhotra *et al.,* (1995) Nature Med. 1:237-243). A remoção pela glicopeptidase dos oligossacarídeos de CAMPATH-1H (um anticorpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconhece o antígeno CDw52 de linfócitos humano) produzido em células de ovário de hamster chinês (CHO) resultou em redução completa na lise mediada pelo complemento (CMCL) (Boyd *et al.,* (1996) *Mol. Immunol*. 32:1311-1318), enquanto a remoção seletiva de resíduos de ácido siálico utilizando neuraminidase não resultou em perda alguma de DMCL. Também foi relatado que a glicosilação de anticorpos afeta a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em particular, foi relatado que células CHO com expressão regulada por tetraciclina de β(1,4)-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII), uma glicosiltransferase que catalisa a formação de GlcNAc bifurcada, tiveram a atividade ADCC

melhorada (Umana *et al.* (1999) *Mature Biotech*. 17:176-180).

[00334] A glicosilação de anticorpos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à ligação da porção carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências dos tripeptídeos asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para ligação enzimática da porção carboidrato à cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina possam também ser utilizadas.

[00335] Variantes de glicosilação de anticorpos são variantes nas quais o padrão de glicosilação de um anticorpo é alterado. Por alterado, entende-se deletar uma ou mais porções carboidrato encontradas no anticorpo, adicionar uma ou mais porções carboidrato ao anticorpo, mudar a composição da glicosilação (padrão de glicosilação), a extensão da glicosilação etc.

[00336] A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo pode ser conseguida alterando a sequência de aminoácidos para que ela contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligada). A alteração pode também ser efetuada pela adição de ou substituição por um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação O-ligada). Do mesmo modo, a remoção de sítios de glicosilação pode ser realizada por alteração dos aminoácidos dentro dos sítios nativos de glicosilação do anticorpo.

[00337] A sequência de aminoácidos é normalmente alterada por alteração da sequência de ácido nucleico subjacente. Esses métodos incluem o isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de sequências de aminoácidos naturais) ou a preparação por mutagênese mediada por

oligonucleotídeos (ou sítio-dirigida), mutagênese por PCR e mutagênese por cassete de uma variante preparada antes ou uma versão não variante do anticorpo.

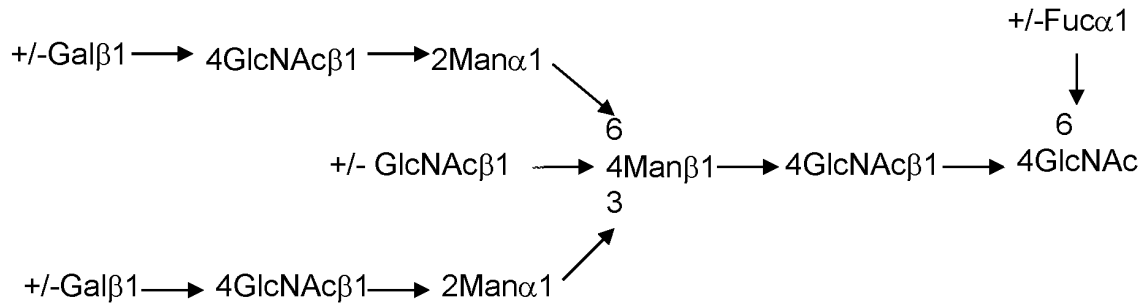
[00338] A glicosilação (incluindo o padrão de glicosilação) de anticorpos pode também ser alterada sem alterar a sequência de aminoácidos ou a sequência nucleotídica subjacente. A glicosilação depende em grande medida da célula hospedeira usada para expressar o anticorpo. Dado que o tipo de célula usada para expressão de glicoproteínas recombinantes, p. ex., anticorpos, como potenciais agentes terapêuticos, raramente é a célula nativa, é possível prever variações significativas no padrão de glicosilação dos anticorpos. Ver, p. ex., Hse *et al.,* (1997) *J. Biol. Chem*. 272:9062-9070. Além da escolha de células hospedeiras, os fatores que afetam a glicosilação durante a produção recombinante de anticorpos incluem modo de crescimento, formulação dos meios, densidade da cultura, oxigenação, pH, esquemas de purificação e fatores semelhantes. Vários métodos foram propostos para alterar o padrão de glicosilação alcançado em um determinado organismo hospedeiro, incluindo a introdução ou superexpressão de certas enzimas envolvidas na produção de oligossacarídeos (Patentes dos E.U.A. N^{os} 5047335; 5510261; 5278299). A glicosilação, ou certos tipos de glicosilação, pode ser removida enzimaticamente da glicoproteína, por exemplo, pelo uso de endoglicosidase H (Endo H). Além disso, a célula hospedeira recombinante pode ser modificada geneticamente, p. ex., tornando-a defeituosa no processamento de certos tipos de polissacarídeos. Essas técnicas e semelhantes são conhecidas no campo.

[00339] A estrutura da glicosilação de anticorpos pode ser prontamente analisada por técnicas convencionais de análise de carboidratos, incluindo cromatografia com lectina, RMN, espectrometria de massas, HPLC, GPC, análise composicional de monossacarídeos, digestão enzimática sequencial e HPAEC-PAD, a qual usa cromatografia de troca aniônica em pH alto para

separar oligossacarídeos com base na carga. Métodos para liberação de oligossacarídeos para fins analíticos são igualmente conhecidos e incluem, sem limitação, tratamento enzimático (realizado comumente utilizando peptídeo-N-glicosidase F/endo-β-galactosidase), eliminação com o uso de ambiente alcalino agressivo para liberar principalmente estruturas O-ligadas e métodos químicos utilizando hidrazina anidra para liberar oligossacarídeos N- e O-ligados.

[00340] Uma forma preferida de modificação da glicosilação de anticorpos é fucosilação do núcleo por redução. "Fucosilação do núcleo" refere-se à adição de fucose ("fucosilação") a N-acetilglicosamina ("GlcNAc") no terminal redutor de um glicano N-ligado.

[00341] Uma "cadeia de açúcar complexa N-glicosídeo-ligada" é tipicamente ligada à asparagina 297 (de acordo com o número de Kabat). Neste relatório descritivo, a cadeia de açúcar complexa N-glicosídeo-ligada possui uma cadeia de açúcar composta biantenária, tendo principalmente a seguinte estrutura:



onde ± indica que a molécula de açúcar pode estar presente ou ausente e os números indicam a posição de ligações entre as moléculas de açúcar. Na estrutura acima, o terminal da cadeia de açúcar que se liga à asparagina é chamado de terminal redutor (à direita) e o lado oposto é chamado de terminal não redutor. Fucose é normalmente ligada à N-acetilglicosamina ("GlcNAc") do terminal redutor, tipicamente por uma ligação α1,6 (a posição 6 de GlcNAc é ligada à posição 1 de fucose). "Gal" refere-se a galactose e "Man" refere-se a manose.

[00342] Uma “cadeia de açúcar complexa N-glicosídeo-ligada” inclui 1) um tipo complexo, no qual o lado terminal não redutor da estrutura do núcleo possui zero, uma ou mais ramificações de galactose-N-acetilglicosamina (também referida como “gal-GlcNAc”) e o lado terminal não redutor de gal-GlcNAc contém opcionalmente um ácido siálico, N-acetilglicosamina bifurcada ou similares; e 2) um tipo híbrido, no qual o lado terminal não redutor da estrutura do núcleo possui ambas as ramificações de uma cadeia de açúcar N-glicosídeo-ligada rica em manose e uma cadeia de açúcar complexa N-glicosídeo-ligada.

[00343] De acordo com os presentes métodos, tipicamente apenas uma quantidade mínima de fucose é incorporada na(s) cadeia(s) de açúcar complexa(s) N-glicosídeo-ligada(s) dos anticorpos anti-TIGIT. Por exemplo, em várias modalidades, menos do que aproximadamente 60%, menos do que aproximadamente 50%, menos do que aproximadamente 40%, menos do que aproximadamente 30%, menos do que aproximadamente 20%, menos do que aproximadamente 15%, menos do que aproximadamente 10%, menos do que aproximadamente 5% ou menos do que aproximadamente 3% dos anticorpos em uma composição exibem fucosilação do núcleo por fucose. Em algumas modalidades, aproximadamente 2% dos anticorpos na composição exibem fucosilação do núcleo por fucose. Em várias modalidades, quando menos do que 60% dos anticorpos em uma composição exibem fucosilação do núcleo por fucose, os anticorpos da composição podem ser referidos como “não fucosilados” ou “afucosilado”. Em algumas modalidades, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

[00344] Em certas modalidades, apenas uma quantidade mínima de um análogo da fucose (ou um metabólito ou produto do análogo da fucose) é incorporada na(s) cadeia(s) de açúcar complexa(s) N-glicosídeo-ligada(s). Por

exemplo, em várias modalidades, menos do que aproximadamente 60%, menos do que aproximadamente 50%, menos do que aproximadamente 40%, menos do que aproximadamente 30%, menos do que aproximadamente 20%, menos do que aproximadamente 15%, menos do que aproximadamente 10%, menos do que aproximadamente 5% ou menos do que aproximadamente 3% de anticorpos anti-TIGIT exibem fucosilação do núcleo por um análogo da fucose ou um metabólito ou produto do análogo da fucose. Em algumas modalidades, aproximadamente 2% dos anticorpos anti-TIGIT exibem fucosilação do núcleo por um análogo da fucose ou um metabólito ou produto do análogo da fucose.

[00345] Em algumas modalidades, menos do que aproximadamente 60%, menos do que aproximadamente 50%, menos do que aproximadamente 40%, menos do que aproximadamente 30%, menos do que aproximadamente 20%, menos do que aproximadamente 15%, menos do que aproximadamente 10%, menos do que aproximadamente 5% ou menos do que aproximadamente 3% dos anticorpos em uma composição contêm um resíduo de fucose em uma estrutura de glicano G0, G1 ou G2. (Ver, p. ex., Raju *et al*., 2012, MAbs 4: 385-391, Figura 3.) Em algumas modalidades, aproximadamente 2% dos anticorpos na composição contêm um resíduo de fucose em uma estrutura de glicano G0, G1 ou G2. Em várias modalidades, quando menos do que 60% dos anticorpos em uma composição contêm um resíduo de fucose em uma estrutura de glicano G0, G1 ou G2, os anticorpos da composição podem ser referidos como “afucosilados”. Em algumas modalidades, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição não contém fucose em uma estrutura de glicano G0, G1 ou G2. Deve-se observar que glicanos G0 incluem glicanos G0-GN. Glicanos G0-GN são glicanos monoantenários com um resíduo GlcNAc terminal. Glicanos G1 incluem glicanos G1-GN.

Glicanos G1-GN são glicanos monoantenários com um resíduo de galactose terminal. Glicanos G0-GN e G1-GN podem ser fucosilados ou não fucosilados.

[00346] Métodos para a produção de anticorpos afucosilados por incubação de células produtoras do anticorpo com um análogo de fucose são descritos, p. ex., em WO2009/135181. Resumidamente, células que foram projetadas para expressar anticorpos anti-TIGIT são incubadas na presença de um análogo de fucose ou de um metabólito intracelular ou produto do análogo da fucose. Um metabólito intracelular pode ser, por exemplo, um análogo modificado por GDP ou um análogo total ou parcialmente desesterificado. Um produto pode ser, por exemplo, um análogo total ou parcialmente desesterificado. Em algumas modalidades, um análogo de fucose pode inibir uma enzima(s) na via de salvamento de fucose. Por exemplo, um análogo da fucose (ou um metabólito intracelular ou produto do análogo da fucose) pode inibir a atividade de fucoquinase, ou GDP-fucose-pirofosforilase. Em algumas modalidades, um análogo da fucose (ou um metabólito intracelular ou produto do análogo da fucose) inibe a fucosiltransferase (de preferência, uma 1,6-fucosiltransferase, p. ex., a proteína FUT8). Em algumas modalidades, um análogo da fucose (ou um metabólito intracelular ou produto do análogo da fucose) pode inibir a atividade de uma enzima na via sintética *de novo* para fucose. Por exemplo, um análogo da fucose (ou um metabólito intracelular ou produto do análogo da fucose) pode inibir a atividade de GDP-manose 4,6-desidratase e/ou GDP-fucose sintetase. Em algumas modalidades, o análogo da fucose (ou um metabólito intracelular ou produto do análogo da fucose) pode inibir um transportador de fucose (p. ex., transportador de GDP-fucose).

[00347] Em uma modalidade, o análogo de fucose é 2-flurofucose. Métodos para utilização de análogos da fucose no meio de crescimento e outros análogos da fucose são revelados, p. ex., em WO 2009/135181, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

[00348] Outros métodos para modificação de linhagens celulares para reduzir a fucosilação do núcleo incluem *knock-outs* (inativação) de genes, *knock-ins* (inserções) de genes e interferência por RNA (RNAi). Nos *knock-outs* gênicos, o gene que codifica FUT8 (enzima 1,6 alfa-fucosiltransferase) é inativado. FUT8 catalisa a transferência de um resíduo fucosilado de GDP-fucose para a posição 6 de GlcNac Asn-ligado (N-ligado) de um N-glicano. FUT8 é relatado por ser a única enzima responsável pela adição de fucose ao carboidrato biantenário N-ligado em Asn297. *Os knock-ins* gênicos adicionam genes que codificam enzimas, tais como GNTIII ou golgi manosidase alfa II. Um aumento nos níveis de tais enzimas em células faz com que os anticorpos monoclonais se desviem da via de fucosilação (levando à fucosilação diminuída do núcleo), e com quantidade aumentada de N-acetilglicosaminas bifurcadas. RNAi tipicamente também atinge a expressão gênica de FUT8, levando a níveis diminuídos do transcrito de mRNA ou à inativação da expressão gênica inteiramente. Qualquer um desses métodos pode ser utilizado para gerar uma linhagem celular que seja capaz de produzir um anticorpo afucosilado, p. ex., um anticorpo anti-TIGIT.

[00349] Existem muitos métodos disponíveis para determinar o grau de fucosilação em um anticorpo. Os métodos incluem, p. ex., LC-MS via cromatografia PLRP-S, TOF MS com quadrupolo de ionização por *electrospray*, eletroforese capilar com fluorescência induzida por laser (CE−LIF*)* e cromatografia por interação hidrofílica com detecção da fluorescência (HILIC).

IV. Métodos terapêuticos usando os anticorpos anti-TIGIT

[00350] Em algumas modalidades, são providos métodos para tratar ou prevenir um câncer em um indivíduo. Em algumas modalidades, o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica e um anticorpo anti-TIGIT. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é afucosilado. Em algumas modalidades, o método compreende administrar ao

indivíduo uma quantidade terapêutica de uma composição farmacêutica compreendendo anticorpos anti-TIGIT, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

[00351] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer ou célula cancerosa que é enriquecido com a expressão de CD112 e/ou CD155. Em algumas modalidades, cânceres enriquecidos com CD112 e/ou CD155 são identificados com avaliação por imuno-histoquímica de amostras do tumor usando anticorpos específicos contra CD112 ou CD155. Em algumas modalidades, a expressão de CD112 ou CD155 é enriquecida ou aumentada em células tumorais ou em leucócitos infiltrantes de tumor. Em algumas modalidades, o câncer é identificado com base na avaliação dos níveis de mRNA de CD112 e/ou CD155 em amostras do tumor (p. ex., por métodos conhecidos na técnica tais como RT-PCR quantitativa). Em algumas modalidades, medições de CD112 ou CD155 solúvel em amostras de sangue obtidas de pacientes com câncer podem ser utilizadas para identificar se um câncer é enriquecido com a expressão de CD112 e/ou CD155. Em algumas modalidades, o método compreende obter uma amostra de um indivíduo (p. ex., uma amostra do tumor ou uma amostra de sangue), medir o nível de CD112 e/ou CD155 na amostra do indivíduo e comparar o nível de CD112 e/ou CD155 na amostra do indivíduo a um valor controle (p. ex., uma amostra de um indivíduo controle sadio ou um nível de expressão de CD112 e/ou CD155 determinado para uma população de controles sadios). Em algumas modalidades, o método compreende determinar se o nível de CD112 e/ou CD155 na amostra do indivíduo é maior do que um valor controle e subsequentemente administrar ao indivíduo um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito.

[00352] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer ou célula cancerosa que é enriquecido com células T ou células *natural killer* (NK) que expressam TIGIT. Em algumas modalidades, cânceres enriquecidos com TIGIT são identificados com avaliação por imuno-histoquímica de amostras do tumor utilizando anticorpos específicos para TIGIT. Em algumas modalidades, utiliza-se um anticorpo que é específico para células T ou células NK (p. ex., anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 ou anti-CD56) para determinar um subconjunto ou subconjuntos de células infiltrantes de tumor que expressam TIGIT. Em algumas modalidades, o câncer é identificado com base na avaliação de níveis do mRNA de TIGIT em amostras do tumor. Em algumas modalidades, medições de TIGIT solúvel em amostras de sangue obtidas de pacientes com câncer podem ser utilizadas (opcionalmente em combinação com um anticorpo que é específico para células T ou células NK) para identificar se um câncer é enriquecido com células T ou células NK que expressam TIGIT. Em algumas modalidades, o método compreende obter uma amostra de um indivíduo (p. ex., uma amostra do tumor ou uma amostra de sangue), medir o nível de TIGIT na amostra do indivíduo, opcionalmente detectando a presença de células T ou células NK (p. ex., utilizando um anticorpo que é específico para células T ou células NK, tal como anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, ou anti-CD56) e comparar o nível de TIGIT na amostra do indivíduo a um valor controle (p. ex., uma amostra de um indivíduo controle sadio ou um nível de expressão de TIGIT determinado para uma população de controles sadios). Em algumas modalidades, o método compreende determinar se o nível de TIGIT na amostra do indivíduo é maior do que um valor controle e subsequentemente administrar ao indivíduo um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito.

[00353] Em algumas modalidades, o câncer é câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de útero, câncer cervical, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de testículo, câncer de esôfago, câncer gastrointestinal, câncer

gástrico, câncer de pâncreas, câncer colorretal, câncer de cólon, câncer de rim, carcinoma renal de células claras, câncer da cabeça e pescoço, câncer de pulmão, adenocarcinoma de pulmão, câncer de estômago, câncer de células germinativas, câncer ósseo, câncer de fígado, câncer de tireoide, câncer de pele, melanoma, neoplasia do sistema nervoso central, mesotelioma, linfoma, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin, mieloma ou sarcoma. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer gástrico, câncer de testículo, câncer de pâncreas, adenocarcinoma de pulmão, câncer de bexiga, câncer da cabeça e pescoço, câncer de próstata, câncer de mama, mesotelioma e carcinoma renal de células claras. Em algumas modalidades, o câncer é linfoma ou leucemia, incluindo, entre outras, leucemia mieloide aguda, mieloide crônica, linfocítica aguda ou linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, linfoma das células do manto, linfoma linfocítico pequeno, linfoma mediastinal primário de grandes células B, linfoma esplênico de células B da zona marginal ou linfoma extranodal de células B da zona marginal. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular e linfoma de Hodgkin. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer metastático.

[00354] Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica de um agente terapêutico adicional. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é um agente imuno-oncológico. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um agente (p. ex., um anticorpo, pequena molécula ou peptídeo) que antagoniza ou inibe um componente de uma via de controle imunológico (*checkpoint imune*), tal como a via de PD-1, a via de CTLA-4, a via de Lag3 ou a via de TIM-3. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um agonista de um coativador de células T (ou seja, um agonista de uma

proteína que estimula a ativação de células T) ao atingir a via de OX-40, a via de 4-1BB (CD137), a via de CD27, a via de ICOS ou a via de GITR.

[00355] Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um inibidor da via de PD-1. Em algumas modalidades, o inibidor da via de PD-1 é um anticorpo anti-PD-1 ou anticorpo anti-PD-L1, tal como, entre outros, pembrolizumabe, nivolumabe, durvalumabe, pidilizumabe, avelumabe ou atezolizumabe. Inibidores da via de PD-1 são descritos na técnica. Ver, p. ex., Dolan *et al*., *Cancer Control*, 2014, 21:231-237; Luke *et al*., Oncotarget, 2014, 6:3479-3492; US 2016/0222113; US 2016/0272708; US 2016/0272712; e US 2016/0319019.

[00356] Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um agonista de um coativador de células T. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um agonista de CD28, CD28H, CD3, 4-1BB (CD137), ICOS, OX40, GITR, CD27 ou CD40. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é uma citocina imunoestimuladora. Em algumas modalidades, a citocinas imune estimuladora imune é fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15) ou interferon gama (IFN-γ). Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é SGN-2FF (Seattle Genetics; ver, p. ex., WO 2009/135181 A2, WO 2012/019165 A2 e WO 2017/096274 A1).

[00357] Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-Tim3, anticorpo anti-Lag3, anticorpo anti-CTLA4, anticorpo anti-41BB, anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD47M, anticorpo anti-CSF1R, anticorpo anti-TLR, anticorpo anti-STING, anticorpo anti-RIGI, anticorpo anti-receptor

quinase TAM, anticorpo anti-NKG2A, um anticorpo anti-NKG2D, um anticorpo anti-GD2, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-PDGFR-α, um anticorpo anti-SLAMF7, um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-cCLB8, um anticorpo anti-KIR e um anticorpo anti-CD52. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é selecionado dentre SEA-CD40 (Seattle Genetics; ver, p. ex., WO 2006/128103 A2 e WO 2016/069919 A1), avelumabe, durvalumabe, nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, atezolizumabe, Hul4.18K322A (anticorpo anti-GD2, St. Jude), Hu3F8 (anticorpo anti-GD2, MSKCC), dinituximabe, trastuzumabe, cetuximabe, olaratumabe, necitumumabe, elotuzumabe, ramucirumabe, pertuzumabe, ipilimumabe, bevacizumabe, rituximabe, obinutuzumabe, siltuximabe, ofatumumabe e alentuzumabe.

[00358] Em algumas modalidades, o tratamento com um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito é combinado com um ou mais outros tratamentos contra o câncer, tais como cirurgia ou radiação. Em algumas modalidades, o tratamento com um anticorpo anti-TIGIT como aqui descrito é combinado com uma ou mais outros agentes contra o câncer, tais como agentes quimioterápicos. Agentes quimioterápicos exemplares não limitantes incluem um agente alquilante (p. ex., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, bussulfano, melfalano, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosureias ou temozolomida), uma antraciclina (p. ex., doxorrubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirrubicina ou mitoxantrona), um desorganizador do citoesqueleto (p. ex., paclitaxel ou docetaxel), um inibidor de histona desacetilase (p. ex., vorinostat ou romidepsina), um inibidor de topoisomerase (p. ex., irinotecano, topotecano, ansacrina, etoposídeo ou teniposídeo), um inibidor de quinase (p. ex., bortezomibe, erlotinibe, gefitinibe, imatinibe, vemurafenibe ou vismodegibe), um análogo de nucleosídeo ou análogo do precursor (p. ex., azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina,

fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, mercaptopurina, metotrexato ou tioguanina), um antibiótico peptídico (p. ex., actinomicina ou bleomicina), um agente à base de platina (p. ex., cisplatina, oxaloplatina ou carboplatina) ou um alcaloide de planta (p. ex., vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel ou docetaxel), galardina, talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

[00359] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente um agente terapêutico adicional) é administrado em uma quantidade ou dose terapeuticamente eficaz. Uma faixa para dose diária entre aproximadamente 0,01 mg/kg e 500 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 mg/kg e 200 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg e 100 mg/kg ou entre aproximadamente 10 mg/kg e 50 mg/kg pode ser utilizada. As doses, no entanto, podem ser variadas de acordo com diversos fatores, incluindo a via de administração escolhida, a formulação da composição, a resposta do paciente, a gravidade da condição, o peso do indivíduo e o juízo do médico responsável. A dose pode ser aumentada ou diminuída ao longo do tempo, conforme requerido por um paciente individual. Em certos casos, é fornecida inicialmente a um paciente uma dose baixa, que é então aumentada até uma dose eficaz tolerável para o paciente. A determinação de uma quantidade eficaz está bem ao alcance dos técnicos no assunto.

[00360] A via de administração de um anticorpo anti-TIGIT ou composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente um agente imuno-oncológico ou outro tratamento terapêutico) pode ser liberação oral, intraperitoneal, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, por inalação, tópica, intralesional, retal, intrabrônquica, nasal, transmucosa, intestinal, ocular ou ótica, ou quaisquer outros métodos conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente um agente imuno-oncológico) é administrado por via oral, intravenosa ou intraperitoneal.

[00361] Os agentes terapêuticos coadministrados (p. ex., o anticorpo anti-TIGIT e um agente terapêutico adicional) podem ser administrados juntos ou separados, simultaneamente ou em momentos diferentes. Quando administrados, os agentes terapêuticos podem ser administrados independentemente uma vez, duas vezes, três, quatro vezes diariamente ou com mais ou menos frequência, se necessário. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos administrados são administrados uma vez ao dia. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos administrados são administrados no mesmo momento ou momentos, por exemplo, como uma mistura. Em algumas modalidades, um ou mais dos agentes terapêuticos são administrados em uma formulação de liberação sustentada.

[00362] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT e um agente terapêutico adicional são administrados simultaneamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT e um agente terapêutico adicional são administrados sequencialmente. Por exemplo, em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT é administrado primeiramente, por exemplo, por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 dias ou mais antes de administrar um agente terapêutico adicional. Em algumas modalidades, um agente terapêutico adicional é administrado primeiramente, por exemplo, por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 dias ou mais antes de administrar um anticorpo anti-TIGIT.

[00363] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente o agente terapêutico adicional) é administrado ao indivíduo durante um período prolongado de tempo, p. ex., por pelo menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 dias ou mais.

V. Composições e kits

[00364] Em outro aspecto, são providos composições e kits compreendendo um anticorpo anti-TIGIT para uso no tratamento ou

prevenção de um câncer em um indivíduo.

Composições farmacêuticas

[00365] Em algumas modalidades, são providas composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo anti-TIGIT para uso na administração a um indivíduo portador de um câncer. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é como aqui descrito, p. ex., um anticorpo anti-TIGIT com afinidade de ligação, atividade, reatividade cruzada, reconhecimento de epítopo e/ou uma ou mais sequências de CDR, VH e/ou VL como aqui reveladas. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é afucosilado.

[00366] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT e um agente terapêutico adicional são formulados em composições farmacêuticas, juntos ou separadamente, como aqui descrito. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é um agente imuno-oncológico, tal como um inibidor da via de PD-1 ou um inibidor da via de CTLA-4. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um agonista de um coativador de células T. Em algumas modalidades, o inibidor da via de PD-1 é um anticorpo anti-PD-1 ou anticorpo anti-PD-L1, tal como, entre outros, pembrolizumabe, nivolumabe, durvalumabe, pidilizumabe ou atezolizumabe.

[00367] Orientação para preparação de formulações para uso na presente invenção é encontrada em, por exemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Ed., 2006, *supra*; *Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, Londres: Pharmaceutical Press; Niazi, *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, 2004, CRC Press; e Gibson, *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*, 2001, Interpharm Press, os quais são aqui incorporados por referência. As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser fabricadas de maneira conhecida pelos técnicos no assunto, ou seja, por meio de processos

convencionais de mistura, dissolução, granulação, confecção de drágeas, emulsificação, encapsulação, captura ou liofilização. Os métodos e excipientes a seguir são simplesmente exemplares e de maneira alguma limitantes.

[00368] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente um agente terapêutico adicional) é preparado para entrega em uma formulação de liberação sustentada, liberação controlada, liberação prolongada, liberação cronometrada ou liberação retardada, por exemplo, em matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o agente terapêutico. Vários tipos de materiais para liberação sustentada foram estabelecidos e são bem conhecidos pelos técnicos no assunto. As formulações atuais de liberação prolongada incluem comprimidos revestidos com película, sistemas multiparticulados ou em *pellet*, tecnologias de matrizes utilizando materiais hidrofílicos ou lipofílicos e comprimidos à base de ceras com excipientes formadores de poros (ver, por exemplo, Huang, *et al*. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 29:79 (2003); Pearnchob, *et al*. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29:925 (2003); Maggi, *et al*. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 55:99 (2003); Khanvilkar, *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 228:601 (2002); e Schmidt, *et al*., *Int. J. Pharm.* 216:9 (2001)). Os sistemas para entrega com liberação sustentada podem, dependendo do seu desenho, liberar os compostos ao longo de horas ou dias, por exemplo, ao longo de 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 horas ou mais. Normalmente, formulações de liberação sustentada podem ser preparadas com polímeros naturais ou sintéticos, por exemplo, vinilpirrolidonas poliméricas, tais como polivinilpirrolidona (PVP); polímeros hidrofílicos de carboxivinila; hidrocoloides hidrofóbicos e/ou hidrofílicos, tais como metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose; e carboxipolimetileno.

[00369] Para administração oral, um anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente um agente terapêutico adicional) pode ser formulado

rapidamente pela combinação com veículos farmaceuticamente aceitáveis que são bem conhecidos na técnica. Tais veículos permitem que os compostos sejam formulados como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, emulsões, suspensões lipofílicas e hidrofílicas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões e similares, para ingestão oral por um paciente a ser tratado. Preparados farmacêuticos para uso oral podem ser obtidos misturando os compostos com um excipiente sólido, opcionalmente moendo a mistura resultante e processando a mistura de grânulos, depois de adicionados auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Os excipientes adequados incluem, por exemplo, cargas tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparados celulósicos tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanta, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionais, tais como polivinilpirrolidona reticulada, ágar ou ácido algínico ou um sal do mesmo tal como alginato de sódio.

[00370] O anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente o agente terapêutico adicional) podem ser formulados para administração parenteral por injeção, p. ex., por injeção em bólus ou infusão contínua. Para injeção, o composto ou compostos podem ser formulados em preparados por dissolução, suspensão ou emulsificação destes em um solvente aquoso ou não aquoso, tal como óleos vegetais ou outros semelhantes, glicerídeos sintéticos de ácidos alifáticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores ou propilenoglicol; e, se desejado, com aditivos convencionais tais como solubilizantes, agentes isotônicos, agentes de suspensão, agentes emulsionantes, estabilizantes e conservantes. Em algumas modalidades, os compostos podem ser formulados em soluções aquosas, de preferência em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hank, solução de Ringer ou solução salina

fisiológica tamponada. As formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dose unitária, p. ex., em ampolas ou em recipientes de doses múltiplas, com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos tais e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes.

[00371] O anticorpo anti-TIGIT (e opcionalmente o agente terapêutico adicional) pode ser administrado sistemicamente por meios transmucoso ou transdérmico. Para administração transmucosa ou transdérmica, são usados penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada na formulação. Para administração tópica, os agentes são formulados em pomadas, cremes, salvas, pós e géis. Em uma modalidade, o agente para liberação transdérmica pode ser DMSO. Os sistemas de liberação transdérmica podem incluir, p. ex., adesivos. Para administração transmucosa, usam-se penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada na formulação. Tais penetrantes são em geral conhecidos na técnica. Formulações exemplares para liberação transdérmica incluem aquelas descritas nas Patentes dos E.U.A. N^{os} 6 589 549; 6 544 548; 6 517 864; 6 512 010; 6 465 006; 6 379 696; 6 312 717 e 6 310 177, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[00372] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um veículo e/ou excipientes aceitáveis. Um veículo farmaceuticamente aceitável inclui quaisquer solventes, meios de dispersão ou revestimentos que sejam fisiologicamente compatíveis e que, de preferência, não interfiram ou do contrário inibam a atividade do agente terapêutico. Em algumas modalidades, o veículo é adequado para administração intravenosa, intramuscular, oral, intraperitoneal, transdérmica, tópica ou subcutânea. Veículos farmaceuticamente aceitáveis podem conter um ou mais compostos fisiologicamente aceitáveis que atuam, por exemplo, no sentido de estabilizar a composição ou aumentar ou diminuir a absorção

do(s) agente(s) ativo(s). Os compostos fisiologicamente aceitáveis podem incluir, por exemplo, carboidratos, tais como glicose, sacarose ou dextranos, antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou glutationa, agentes quelantes, proteínas de baixo peso molecular, composições que reduzem a depuração ou hidrólise dos agentes ativos, ou excipientes ou outros estabilizantes e/ou tampões. Outros veículos farmaceuticamente aceitáveis e suas formulações são bem conhecidos e em geral descritos em, por exemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmac*y, 21a edição, Filadélfia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Vários excipientes farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados em, por exemplo, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (5ª ed., Ed. Rowe *et al.*, Pharmaceutical Press, Washington, D.C.).

[00373] As doses e concentrações desejadas do fármaco de composições farmacêuticas da invenção podem variar dependendo do uso em particular cogitado. A determinação da dose apropriada ou via de administração está ao alcance do técnico no assunto. Doses adequadas são também aqui descritas.

Kits

[00374] Em algumas modalidades, são providos kits para uso no tratamento de um indivíduo portador de um câncer. Em algumas modalidades, o kit compreende:

um anticorpo anti-TIGIT; e

um agente terapêutico adicional.

[00375] Em algumas modalidades, anticorpo anti-TIGIT é como aqui descrito, p. ex., um anticorpo anti-TIGIT com afinidade de ligação, atividade, reatividade cruzada, reconhecimento de epítopo e/ou uma ou mais sequências de CDR, VH e/ou VL como aqui reveladas. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT é afucosilado. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é um agente imuno-oncológico, tal como um inibidor da

via de PD-1 ou um inibidor da via de CTLA-4. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é um agonista de um coativador de células T. Em algumas modalidades, o inibidor da via de PD-1 é um anticorpo anti-PD-1 ou anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, o agente imuno-oncológico é pembrolizumabe, nivolumabe, durvalumabe, pidilizumabe ou atezolizumabe.

[00376] Em algumas modalidades, os kits podem compreender ainda materiais instrutivos contendo orientações (ou seja, protocolos) para a prática dos métodos desta invenção (p. ex., instruções sobre o uso do kit para tratar um câncer). Embora compreendam tipicamente materiais redigidos ou impressos, os materiais com instruções não se limitam a isso. Qualquer meio capaz de armazenar tais instruções e comunica-las a um usuário final é contemplado por esta invenção. Tais mídias incluem, entre outros, meios de armazenamento eletrônico (p. ex., discos magnéticos, fitas, cartuchos, chips), mídia óptica (p. ex., CD ROM) e similares. Tais mídias podem incluir endereços de sites na Internet que fornecem tais materiais com instruções.

VI. Exemplos

[00377] Os exemplos discutidos abaixo pretendem ser simplesmente exemplares da invenção e não devem ser considerados como limitações à invenção de maneira alguma. Os exemplos não se destinam a declarar que os experimentos abaixo sejam todos ou os únicos experimentos realizados. Foram feitos esforços para assegurar a exatidão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura etc.), mas alguns erros experimentais e desvios devem ser reconhecidos. A menos que indicado o contrário, as partes são partes em peso, a massa molar é massa molar média, a temperatura é em graus centígrados e a pressão é próxima ou a atmosférica.

Exemplo 1: Geração de anticorpos anti-TIGIT

[00378] Anticorpos monoclonais inteiramente humanos anti-TIGIT foram gerados utilizando um sistema de apresentação de anticorpo baseado

em leveduras (ver, p. ex., Xu *et al*, "*Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool*", *PEDS,* 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256; e WO 2012/009568). Oito bibliotecas de sintéticos humanos virgens em leveduras, cada uma com ~10^9 de diversidade foram rastreadas. Para as duas primeiras rodadas de seleção, empregou-se uma técnica de separação com esfera magnética utilizando o sistema Miltenyi MACS, como descrito anteriormente (ver, p. ex., Siegel *et al*, "*High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library*", *J Immunol Methods,* 2004, 286:141-153). Resumidamente, células de levedura (~10^{10} células/biblioteca) foram incubadas com 5 mL de antígeno de fusão com Fc biotinilado a 10 nM por 30 minutos a 30 ºC em tampão de lavagem (solução salina com tampão fosfato (PBS)/albumina sérica bovina 0,1% (BSA)). Depois de lavado uma vez com 40 mL de tampão de lavagem gelado, o *pellet* celular foi ressuspenso em 20 mL de tampão de lavagem e MicroBeads de estreptavidina (500 μL) foram adicionadas às leveduras e incubadas por 15 minutos a 4 ºC. Em seguida, as leveduras foram peletizadas, ressuspensas em 20 mL de tampão de lavagem e carregadas em uma coluna Miltenyi LS. Depois que os 20 mL foram carregados, a coluna foi lavada 3 vezes com 3 mL de tampão de lavagem. A coluna foi então removida do campo magnético e a levedura foi eluída com 5 mL de meio de crescimento e então cultivada durante a noite. Os ciclos seguintes de seleção foram realizados com citometria de fluxo. Aproximadamente 2×10^7 leveduras foram peletizadas, lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas a 30 ºC com antígeno de fusão com Fc 10 nM e concentrações decrescentes do antígeno monomérico biotinilado (100 a 1 nM) sob condições de equilíbrio, antígenos de fusão com Fc biotinilados 10 nM ou antígenos monoméricos 100 nM de espécies diferentes a fim de obter reatividade cruzada entre as espécies, ou com um reagente de depleção de poli-especificidade (PSR) para

remover anticorpos não específicos da seleção. Para a depleção com PSR, as bibliotecas foram incubadas com uma diluição 1:10 de reagente PSR biotinilado como descrito anteriormente (ver, p. ex., Xu *et al*, *supra*). As leveduras foram então lavadas duas vezes com tampão de lavagem e coradas com LC-FITC (diluído 1:100) e com os reagentes secundários SA-633 (diluído 1:500) ou EA-PE (extravidina-R-PE, diluído 1:50) por 15 minutos a 4 ºC. Depois de lavados duas vezes com tampão de lavagem, os *pellets* celulares foram ressuspensos em 0,3 mL de tampão de lavagem e transferidos para tubos de separação com tampa do tipo *strainer* (filtro). A separação foi realizada utilizando um separador FACS ARIA (BD Biosciences) e *gates* para separação foram determinados para selecionar anticorpos com as características desejadas. As rodadas de seleção foram repetidas até ter sido obtida uma população com todas as características desejadas. Depois da rodada final de separação, as leveduras foram semeadas e colônias individuais foram coletadas para caracterização.

[00379] Os antígenos incluíram TIGIT humano-Fc dimérico recombinante (Acro Biosystems TIT-H5254), TIGIT humano monomérico (Sino Biological 10917-H08H), TIGIT de camundongo-Fc dimérico (R&D Systems, 7267-TG) e TIGIT de camundongo monomérico (Sino Biologics 50939-M08H).

[00380] Campanha de virgens: 744 clones foram sequenciados produzindo 345 clones únicos (CDRH3 única). 18 linhagens germinativas de VH foram representadas nos clones.

[00381] Campanha para diversificação em batelada de cadeias leves: Plasmídeos da cadeia pesada *(*VH) de um *pool* enriquecido com aglutinante do ciclo seis das seleções para verificação de virgens foram extraídos das leveduras pela técnica de Smash e Grab, propagados em e subsequentemente purificados de *E. Coli* e, a seguir, transformados em uma biblioteca de cadeia leve com diversidade de 10^7.

[00382] As seleções foram realizadas sob essencialmente as mesmas condições que as utilizadas para a verificação de virgens.. Resumidamente, uma rodada de enriquecimento com esferas magnéticas foi seguido por três rodadas de seleção por citometria de fluxo. Na rodada de enriquecimento com esferas magnéticas, usou-se o antígeno de fusão com Fc biotinilado 10 nM. O primeiro ciclo no citômetro de fluxo consistiu em uma rodada de seleção positiva utilizando antígeno monovalente bionitilado 100 nM. Este foi seguido por uma segunda rodada, que consistiu em uma rodada de seleção negativa para depleção com PSR. A rodada final (terceira) consistiu em uma rodada de seleção positiva, no qual o antígeno monovalente foi titulado a 100 nM, 10 nM, 1 nM. Para todas as bibliotecas, as leveduras das separações a 1 nM desse terceiro ciclo foram semeadas e colônias individuais foram coletadas e distinguidas. No total, 728 clones foram sequenciados, produzindo 350 combinações HC/LC únicas (93 CDRH3s únicas).

[00383] No total, 695 clones únicos foram identificados entre as campanhas para virgens e em batelada por *shuffle* (embaralhamento) de cadeias leves.

Exemplo 2: Caracterização de anticorpos anti-TIGIT

[00384] 65 clones foram selecionados para produção e avaliação adicional, representando 12 linhagens germinativas de VH e 9 linhagens germinativas de VL.

Produção e purificação de anticorpos

[00385] Clones de leveduras foram cultivados até a saturação e, então, induzidos por 48 horas a 30 ºC com agitação. Após a indução, as células de leveduras foram peletizadas e os sobrenadantes foram coletados para purificação. IgGs foram purificadas usando uma coluna com Proteína A e eluídas com ácido acético, pH 2,0. Fragmentos Fab foram gerados por digestão com papaína e purificados com KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

Ligação de anticorpos anti-TIGIT à proteína humana recombinante e de camundongo

[00386] Foram realizadas medições da afinidade em um Octet RED384 ForteBio em geral como descrito anteriormente (ver, p. ex., Estep *et al*., "*High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning*", *Mabs*, 2013, 5:270-278). Resumidamente, medições da afinidade no ForteBio foram realizadas carregando IgGs em linha em sensores AHQ. Os sensores foram equilibrados fora da linha em tampão do ensaio por 30 minutos e então monitorados por 60 segundos para estabelecimento do basal. Sensores com IgGs carregadas foram expostos ao antígeno a 100 nM (antígeno de fusão com Fc dimérico ou antígeno monomérico) por 3 minutos e, depois disso, foram transferidos para tampão do ensaio por 3 minutos para medição da constante (da taxa para) dissociação. Toda a cinética da ligação e dissociação foi analisada utilizando o modelo de ligação 1:1.

[00387] Dos 65 clones de IgG, 43 tinham uma afinidade pelo monômero de TIGIT < 100 nM. Dos 65 clones de IgG, 34 apresentaram reatividade cruzada com TIGIT de camundongo-Fc. A afinidade de ligação de clones selecionados é mostrada na Tabela 1 abaixo.

Epitope binning/ensaio de competição por ligante

[00388] *Epitope binning*/bloqueio de ligantes foi realizado utilizando um ensaio de bloqueio cruzado padrão no formato sanduíche no sistema ForteBio Octet RED384. Anti-IgG alvo controle foi carregada em sensores AHQ e sítios não ocupados para ligação com Fc no sensor foram bloqueados com um anticorpo IgG1 humano irrelevante. Os sensores foram então expostos ao antígeno alvo a 100 nM seguido por um segundo anticorpo anti-alvo ou ligante (CD155-Fc humano (Sino Biological, 10109-H02H)). A ligação adicional pelo segundo anticorpo ou ligante após a associação do antígeno indica um epítopo desocupado (não competidor), enquanto nenhuma ligação indica bloqueio do epítopo (bloqueio pelo competidor ou ligante).

[00389] Quatro anticorpos *binning* (competidores) (não mutuamente exclusivos) foram usados para avaliação da competição (*bin*) e cinco perfis sobrepostos de *binning* foram identificados. 63 dos 65 anticorpos anti-TIGIT competiram com o ligante pela ligação a hTIGIT-Fc. Os perfis de *binning* e os resultados da competição com o ligante de clones selecionados são mostrados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. *Epitope binning*, competição com ligante e dados de afinidade de clones anti-TIGIT selecionados

Clone	Código *bin*	Competição com CD155	IgG KD TIGIT humano-Fc (M)	IgG KD TIGIT humano monômero (M)	IgG KD TIGIT de camundongo-Fc (M)
2	1, 2, 3, 4	Sim	9,56E-10	1,01E-08	2,03E-09
3	1, 2, 3, 4	Sim	2,77E-09	7,36E-08	5,64E-09
5	1, 2, 3, 4	Sim	9,85E-10	1,41E-08	3,25E-09
13	1, 2, 3	Sim	5,43E-10	2,56E-09	1,16E-10
14	1, 2, 3	Sim	2,01E-09	5,87E-08	2,43E-09
16	1, 2, 3	Sim	6,90E-10	2,06E-09	1,05E-08
18	1, 2, 3	Sim	2,39E-09	5,08E-08	8,82E-09
21	1, 2, 3	Sim	5,85E-10	2,18E-09	N.B.
22	1, 2, 3	Sim	7,90E-10	1,38E-08	1,05E-08
25	1, 2, 3	Sim	6,20E-10	6,18E-10	1,10E-09
27	1, 2, 3	Sim	5,58E-10	2,32E-09	N.B.
54	1, 2, 3	Sim	6,89E-10	3,49E-09	N.B.

Observações:
N.B. = Não ligador sob as condições desse ensaio
Os dados do código Bin e competição com CD155 foram gerados no sistema ForteBio Octet RED384 usando um ensaio de bloqueio cruzado padrão no formato sanduíche como descrito no Exemplo 2.
Os dados de afinidade KD foram gerados no sistema ForteBio Octet RED384 como descrito no Exemplo 2.
Ligação de anticorpos anti-TIGIT a TIGIT humano, de camundongo e de macaco Cynomolgus superexpressos em células HEK 293

[00390] Células HEK 293 foram modificadas para expressar estavelmente altos níveis de TIGIT humano, de camundongo e de macaco Cynomolgus por transdução lentiviral. Aproximadamente 100.000 células HEK 293 (TIGIT-negativas) originais ou células HEK 293 com superexpressão de TIGIT humano, de camundongo ou de macaco Cynomolgus foram coradas com 100 nM de cada anticorpo anti-TIGIT por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com tampão de lavagem e incubadas com anti-IgG humana conjugado a PE por 15 minutos em gelo. As células foram então lavadas duas vezes com

tampão de lavagem e analisadas por citometria de fluxo em um instrumento FACS Canto II (BD Biosciences). O número de vezes em relação ao fundo (*Fold over background*, FOB) foi calculado como a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) do clone anti-TIGIT ligado a células alvo-positivas, dividido pela MFI do clone anti-TIGIT ligado a células alvo-negativas.

[00391] Como mostrado na Figura 1, todos os 65 anticorpos mostraram ligação específica à linhagem 293-hTIGIT (FOB>10, como indicado pela linha preta horizontal no quadro). 53 clones ligaram-se especificamente à linhagem 293-cyTIGIT enquanto 31 clones ligaram-se especificamente à linhagem 293-mTIGIT.

Ensaio com reagente de poliespecificidade (PSR)

[00392] A avaliação da ligação a um reagente de poliespecificidade foi conduzida para determinar a especificidade por TIGIT como descrito anteriormente (ver, p. ex., Xu *et al*, *supra*). Resumidamente, o reagente PSR biotinilado, diluído 1:10 do estoque, foi incubado com leveduras apresentadoras de IgG por 20 minutos em gelo. As células foram lavadas e marcadas com EA-PE (extravidina-R-PE) e lidas em um analisador de FACS. A pontuação da ligação poliespecífica é em uma escala de 0 a 1 e correlaciona-se com IgGs controle com baixa, média e alta ligação não específica, com escore de 0 indicando nenhuma ligação e escore de 1 indicando ligação não específica muito alta.

[00393] 62 dos 65 clones foram pontuados como ligadores não poliespecíficos com escore PSR < 0,10. Três clones pontuaram como baixos ligadores poliespecíficos (escore PSR 0,10 – 0,33).

Ensaio de cromatografia de interação hidrofóbica

[00394] A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) foi realizada como descrita anteriormente (Estep *et al*., *supra*). Resumidamente, 5 μg de amostras de IgG foram dopadas com uma solução de fase móvel A (sulfato de amônio 1,8 M e fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,6) para alcançar uma

concentração final de sulfato de amônio de aproximadamente 1 M antes da análise. Uma coluna Sepax Proteomix HIC butyl-NP5 foi usada com gradiente linear da fase móvel A e solução da fase móvel B (fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5) durante 20 minutos a uma vazão de 1 mL/minuto com monitoramento da absorbância UV a 280 nM.

[00395] A retenção aumentada de anticorpos em colunas hidrofóbicas correlacionou-se com hidrofobicidade aumentada e uma propensão para pouca expressão, agregação ou precipitação durante a purificação. Cinco dos 65 clones apresentaram tempo de retenção alto na HIC > 11,5 minutos, 10 clones apresentaram tempo de retenção médio na HIC de 10,5 – 11,5 minutos e o restante dos clones apresentou tempos de retenção baixos na HIC.

Exemplo 3: Ligação de anticorpos anti-TIGIT a TIGIT humano, de camundongo e de macaco Cynomolgus expressos endogenamente em células T primárias

[00396] 65 anticorpos que mostraram ser específicos para proteína TIGIT humano recombinante e TIGIT humano expressos em células HEK 293 foram avaliados quando à sua capacidade para ligarem-se ao TIGIT endógeno em células T primárias do sangue periférico humano. Os anticorpos foram também avaliados quanto à reatividade cruzada ao TIGIT de Cynomolgus em células T do sangue periférico e 35 dos 65 clones foram avaliados quanto à reatividade cruzada ao TIGIT de camundongo em células T esplênicas ativadas.

[00397] Células T pan humanas foram isoladas negativamente do produto de leucoférese com 99% de pureza. 100.000 células foram coradas a 4 ºC por 30 minutos com 20 μg/mL de cada anticorpo anti-TIGIT. Os anticorpos anti-TIGIT foram detectados com anti-IgG humana policlonal de cabra, conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo CytoFLEX. O percentual de TIGIT+ da população de linfócitos com *gate* em FSC/SSC foi determinado

para cada anticorpo usando a coloração somente de anti-IgG humana-PE para determinar o limiar para positividade.

[00398] Leucócitos de Cynomolgus foram isolados do sangue total por lise dos eritrócitos (eBioscience 00-4300). 200.000 células foram coradas a 4 ºC por 30 minutos com 20 μg/mL de cada anticorpo anti-TIGIT. Os anticorpos anti-TIGIT foram detectados com anti-IgG humana policlonal de cabra adsorvido contra imunoglobulinas de macaco conjugadas a AlexaFluor647 (SouthernBiotech 2049-31) e células T foram identificadas por contra-coloração com o clone SP34 anti-CD3 conjugado a FITC (BD Pharmingen 556611). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo CytoFLEX. O percentual de TIGIT+ da população CD3+ foi determinado para cada anticorpo usando coloração apenas de anti-IgG humana-PE para determinar o limiar para positividade.

[00399] Células T de camundongo BALB/c foram isoladas de baços por seleção negativa (Stem Cell Technologies 19851A) até >99% de pureza. As células foram ativadas por 24 horas com o clone 145-2C11 anti-CD3 ligado à placa (BioLegend 100302) para regulação positiva de TIGIT. 200.000 células ativadas foram coradas a 4 ºC por 30 minutos com 20 μg/mL de cada anticorpo anti-TIGIT (35 de 65 clones testados). Os anticorpos anti-TIGIT foram detectados com anti-IgG humana policlonal de cabra conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur. A mediana da intensidade de fluorescência da população de linfócitos com *gate* em FSC/SSC foi determinada para cada anticorpo.

[00400] A Figura 2 mostra a ligação de 65 clones do anticorpo anti-TIGIT e um anticorpo controle de isótipo irrelevante a células T humanas primárias, de macaco Cynomolgus e de camundongo. Os Clones 13 e 25 mostraram forte ligação a todas as três espécies de células T.

Ligação titulável de anticorpos anti-TIGIT a TIGIT expresso

na superfície celular

[00401] Células HEK 293 foram modificadas para expressar estavelmente altos níveis de TIGIT humano, de camundongo ou de macaco Cynomolgus por transdução lentiviral. 200.000 células 293-TIGIT foram coradas a 4 ºC por 30 minutos com uma titulação 3 vezes de 10 pontos (30 a 0,002 μg/mL) de cada anticorpo anti-TIGIT. Os anticorpos anti-TIGIT foram detectados com anti-IgG humana policlonal de cabra conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo CytoFLEX. A mediana da intensidade de fluorescência da população com *gate* em FSC/SSC foi determinada para cada concentração do anticorpo. A regressão não linear de dados transformados em Log(X) foi usada para gerar os valores de EC50 no GraphPad Prism 6. Nenhum dos anticorpos anti-TIGIT mostrou ligação a células HEK 293 originais (TIGIT-) (dados não mostrados). A Figura 3A-C mostra a titulação da ligação e a Figura 3D mostra a EC50 da ligação de oito clones do anticorpo anti-TIGIT (clone 2, clone 5, clone 13, clone 16, clone 17, clone 20, clone 25 e clone 54) a TIGIT humano, de macaco Cynomolgus e de camundongo expressos em células HEK 293.

[00402] Células T de camundongo C57BL/6 foram isoladas de baços por seleção negativa (Stem Cell Technologies 19851A) até >99% de pureza. As células foram ativadas por 24 horas com o clone 145-2C11 anti-CD3 ligado à placa (BioLegend 100302) para regulação positiva de TIGIT. 200.000 células foram coradas a 4 ºC por 30 minutos com uma titulação 3 vezes de 8 pontos (30 a 0,014 μg/mL) de cada anticorpo anti-TIGIT. Os anticorpos anti-TIGIT foram detectados com anti-IgG humana policlonal de cabra conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur. A mediana da intensidade de fluorescência da população de linfócitos com *gate* em FSC/SSC foi determinada para cada anticorpo. A regressão não linear de

dados transformados em Log(X) foi usada para gerar valores de EC50 no GraphPad Prism 6. A Figura 4 mostra a titulação da ligação e EC50 a ligação dos clones 13 e 25 anti-TIGIT às células T esplênicas ativadas de camundongo.

Exemplo 4: Anticorpos anti-TIGIT bloqueiam a ligação do ligante CD155 e CD112 a TIGIT expresso na superfície celular

[00403] Células HEK 293 foram modificadas para expressar estavelmente altos níveis de TIGIT humano ou de camundongo por transdução lentiviral. hCD155-Fc (Sino Biological 10109-H02H), hCD112-Fc (Sino Biological 10005-H02H) e mCD155-Fc (Sino Biological 50259-M03H) foram conjugados a AlexaFluor647 (ThermoFisher A30009). 200.000 células 293-hTIGIT ou 293-mTIGIT foram coincubadas com CD155-Fc-AlexaFluor647 1 μg/mL ou CD112-Fc-AlexaFluor647 5 μg/mL e uma titulação 2 vezes de 12 pontos (10 a 0,005 μg/mL) de cada anticorpo anti-TIGIT ou um anticorpo de isótipo controle. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo CytoFLEX. A mediana da intensidade de fluorescência da população com *gate* em FSC/SSC foi determinada para cada concentração do anticorpo. O bloqueio percentual foi calculado em relação à MFI no controle sem anticorpo. A regressão não linear de dados transformados em Log(X) foi realizada no GraphPad Prism 6.

[00404] Como mostrado na Figura 5A-B, seis clones do anticorpo anti-TIGIT (clone 2, clone 5, clone 13, clone 17, clone 25 e clone 55) foram testados e cinco dos seis clones (clone 2, clone 5, clone 13, clone 17 e clone 25) bloquearam significativamente a interação de CD155 com TIGIT expresso em células HEK 293 para CD155 humano/TIGIT humano e para CD155 de camundongo/TIGIT de camundongo. O clone 55 liga-se especificamente a TIGIT humano, mas não compete com hCD155-Fc pela ligação a hTIGIT-Fc no ensaio de competição com ligante em ForteBio Octet. Do mesmo modo, o clone 55 não bloqueou eficientemente a interação de

hCD155 com a linhagem de células 293-hTIGIT. O clone 2, clone 5, clone 13, clone 17 e clone 25 foram também capazes de interromper a ligação de CD112 humano a TIGIT humano. Como observado para CD155, o clone 55 foi muito menos eficaz no bloqueio da interação CD112-TIGIT. Ver a Figura 6.

Exemplo 5: Atividade *in vitro* de anticorpos anti-TIGIT em um bioensaio de bloqueio TIGIT/CD155

[00405] A atividade de anticorpos anti-TIGIT pode ser distinguida funcionalmente utilizando um bioensaio do bloqueio TIGIT/CD155 (p. ex., TIGIT/CD155 Blockade Bioassay Kit, Promega Corp., Madison, WI), no qual a expressão de um gene repórter é induzida ou reforçada quando um anticorpo bloqueia a interação TIGIT/CD155. O bioensaio do bloqueio TIGIT/CD155 compreende dois tipos de células: uma célula efetora expressando TIGIT, CD226 e um complexo TCR na superfície da célula e contendo um gene repórter luciferase; e uma célula apresentadora de antígeno artificial que expressa CD155 e um ativador de TCR na superfície celular. Nesse bioensaio, a expressão de luciferase requer o envolvimento de TCR mais um sinal coestimulador. A interação CD155-TIGIT tem maior afinidade do que a interação CD155-CD226, resultando em uma sinalização inibidora final e nenhuma expressão de luciferase. O bloqueio da interação CD155-TIGIT permite a coestimulação de CD155-CD226 impulsionando a expressão de luciferase.

[00406] Células Jurkat efetoras, expressando TIGIT e CD226, foram cocultivadas com células CHO-K1 apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) expressando um ativador de TCR e CD155. As células Jurkat efetoras contêm um gene repórter luciferase direcionado pelo promotor de IL-2. Na ausência de anticorpos bloqueadores anti-TIGIT, o envolvimento CD155-TIGIT leva à coinibição das células T e nenhuma atividade do promotor de IL-2. Quando da adição de anticorpos anti-TIGIT, a interação

CD155-TIGIT é interrompida permitindo que CD155 se associe com CD226 e enviem um sinal coestimulador e impulsionem a expressão de luciferase.

[00407] aAPCs foram espalhadas em placas com 96 poços e deixadas aderir durante a noite. No dia seguinte, 20 μg/mL de cada anticorpo anti-TIGIT ou um anticorpo de isótipo controle e células Jurkat efetoras foram adicionadas à placa. Após 6 horas de incubação a 37 ºC, as células foram lisadas e o substrato luciferase foi adicionado. A atividade luciferase foi quantificada em um leitor de placas. A atividade luciferase foi calculada como o número de vezes em relação ao sinal no controle sem anticorpo.

[00408] Como mostrado na Figura 7A-7B, 12 clones do anticorpo anti-TIGIT demonstraram bloqueio funcional nesse bioensaio.

Exemplo 6: Atividade *in vitro* de anticorpos anti-TIGIT em um bioensaio da combinação TIGIT/PD-1

[00409] A atividade sinérgica de anticorpos anti-TIGIT em combinação com agentes anti-PD-1 (p. ex., anti-PD-1 anticorpos) pode ser distinguida funcionalmente usando um bioensaio da combinação TIGIT/PD-1, no qual a expressão de um gene repórter é reforçada quando anticorpos bloqueiam a interação TIGIT/CD155 e a interação PD-1/PD-L1. O bioensaio compreende dois tipos de células: uma célula efetora que expressa TIGIT, CD226, PD-1 e um complexo TCR na superfície da célula e contendo um gene repórter luciferase; e uma célula apresentadora de antígeno artificial que expressa CD155, PD-L1 e um ativador de TCR na superfície celular. Nesse bioensaio, a expressão de luciferase requer o envolvimento de TCR mais um sinal coestimulador. A interação CD155-TIGIT tem maior afinidade do que a interação CD155-CD226, resultando em sinalização inibidora final e nenhuma expressão de luciferase. Além disso, a ligação de PD-L1 a PD-1 inibe a expressão de luciferase. O bloqueio da interação CD155-TIGIT e da interação PD-1/PD-L1 ameniza a inibição e permite a coestimulação de CD155-CD226 impulsionando a expressão de luciferase.

[00410] Células Jurkat efetoras expressando PD-1, TIGIT e CD226 foram cocultivadas com células CHO-K1 apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) expressando um ativador de TCR, PD-L1 e CD155. As células Jurkat efetoras contêm um gene repórter luciferase direcionado pelo promotor de IL-2. Na ausência de anticorpos bloqueadores anti-TIGIT, o envolvimento de PD-L1-PD-1 e CD155-TIGIT leva à coinibição das células T e nenhuma atividade do promotor de IL-2. Quando da adição de anticorpos anti-PD-1 e anti-TIGIT, a interação PD-L1-PD-1 é bloqueada, amenizando um sinal coinibidor e a interação CD155-TIGIT é interrompida, permitindo que CD155 se associe com CD226 e enviem um sinal coestimulador e impulsionem a produção de luciferase.

[00411] aAPCs foram espalhadas em placas com 96 poços e deixadas aderir durante a noite. No dia seguinte, uma titulação 2,5 vezes de 10 pontos (100 a 0,03 μg/mL) de cada anticorpo anti-TIGIT ou anticorpo anti-PD-1 (clone EH12.2H7, BioLegend, San Diego, CA) sozinhos ou de cada anticorpo anti-TIGIT + anticorpo anti-PD-1 (proporção 1:1) e células Jurkat efetoras foram adicionados à placa. Após 6 horas de incubação a 37 ºC, as células foram lisadas e o substrato de luciferase foi adicionado. A atividade luciferase foi quantificada em um leitor de placas. A atividade luciferase foi calculada como o número de vezes em relação ao sinal no controle sem anticorpo. Como mostrado na Figura 8, nem anti-TIGIT nem anti-PD-1 sozinhos levaram à ativação dramática de células Jurkat, no entanto, a combinação de do clone 13 ou clone 25 anti-TIGIT com anti-PD-1 resultou em forte ativação.

Exemplo 7: Atividade *in vivo* de anticorpos anti-TIGIT em um modelo de tumor singênico CT26 em camundongos BALB/c

[00412] Tendo por base a afinidade por TIGIT murino, o clone 13 anti-TIGIT foi escolhido para avaliação em um modelo de tumor singênico murinho. IgG1 de camundongo e quimeras IgG2a de camundongo do clone 13 anti-TIGIT totalmente humano original foram geradas para experimentos

in vivo a fim de abordar a pergunta se o isótipo Fc tem efeito sobre a eficácia *in vivo* de anticorpos antagonistas contra TIGIT. *In vitro*, os anticorpos quiméricos mostraram atividade semelhante ao anticorpo hIgG1 original em relação a (1) a ligação a TIGIT humano, de camundongo e de macaco Cynomolgus, (2) o bloqueio da ligação dos ligantes CD155 e CD112 ao TIGIT expresso na superfície celular e (3) a atividade no bioensaio do bloqueio CD155-TIGIT. Ver a Figura 9A-9H.

[00413] Camundongos BALB/c de 8 semanas de idade com peso corporal médio de 19 g foram obtidos do Charles River Laboratories. Os camundongos foram implantados por via subcutânea com 300.000 células CT26 de carcinoma de cólon no flanco lateral direito. Deixou-se que os tumores progredissem até o volume tumoral do grupo fosse em média 72 mm^3 (intervalo de 48-88 mm^3) no 7º dia após a inoculação do tumor. Os animais foram alocados em 10 grupos de tratamento de n=10 por par combinado de tal modo que o volume tumoral médio do grupo fosse semelhante entre todos os grupos de tratamento. O comprimento e a largura do tumor foram medidos e o volume tumoral foi calculado pela fórmula: Volume (mm^3) = 0,5 * Comprimento * $Largura^2$, onde o comprimento é a dimensão mais longa. O clone 13 mIgG1 anti-TIGIT, o clone 13 mIgG2a anti-TIGIT e o clone RMP1-14 anti-PD-1 (BioXCell) foram diluídos até a concentração adequada para administração em PBS estéril. PBS estéril foi usado como o veículo controle. Anticorpos contra TIGIT foram administrados nas doses de 5 ou 20 mg/kg via injeção intraperitoneal, duas vezes semanalmente por 3 semanas (6 doses, no total). O anticorpo anti-PD-1 foi administrado na dose de 5 mg/kg via injeção intraperitoneal, duas vezes semanalmente por 2 semanas (4 doses, no total). A administração iniciou no dia da alocação (Dia 1 do estudo). Medições do volume tumoral e peso corporal foram coletadas duas vezes por semana até que os camundongos atingissem um corte para volume tumoral de 2000 mm^3. Nenhum dos animais exibiu perda do peso corporal em relação ao peso antes

da dose, indicando tolerabilidade excepcional de todos os agentes em teste.

[00414] Como mostrado na Figura 10A, o anti-mPD-1 sozinho não teve qualquer efeito sobre a progressão do tumor. A quimera mIgG1 anti-TIGIT do clone 13 (“13-1”), que não envolve com eficiência receptores Fc-gama ativadores, não mediou qualquer atividade antitumoral, quer como agente único ou em combinação com anti-PD-1. Em contraste, a quimera mIgG2a do clone 13 (“13-2”), que é capaz de ligar-se a receptores Fc-gama ativadores, desacelerou a progressão do tumor (86,5% (5 mg/kg) ou 74,4% (20 mg/kg) de inibição do crescimento tumoral no Dia 18). Três de dez animais no grupo de 13-2, 5 mg/kg, como agente único mostraram regressões tumorais completas que permaneceram estáveis até o final do estudo (Dia 46 do estudo). No grupo de 13-2, 20 mg/kg, como agente único, dois de dez animais mostraram regressões tumorais parciais (definida como volume tumoral <50% do volume inicial por três medições consecutivas). A Figura 10A mostra que a adição do anti-PD-1 à quimera mIgG2a do clone 13 (13-2) não aumentou a eficácia em relação a 13-2 isoladamente (Inibição do crescimento tumoral no Dia 18 de 53,8% (anti-TIGIT 5 mg/kg + anti-PD-15 mg/kg) *versus* 86,5% (anti-TIGIT 5 mg/kg isoladamente) e 89,6% (anti-TIGIT 20 mg/kg + anti-PD-15 mg/kg) *versus* 74,4% (anti-TIGIT 20 mg/kg isoladamente). Números semelhantes de respondedores completos e parciais foram observados nos grupos da combinação. Ver, p. ex., Figura 10B-10K.

Exemplo 8: Otimização de anticorpos e caracterização de anticorpos otimizados

[00415] Os clones 2, 13, 16 e 25 de anticorpos, resultantes da verificação primária, foram selecionados para maturação da afinidade adicional. A otimização de anticorpos foi realizada pela introdução de diversidades na região variável da cadeia pesada. Dois ciclos de otimização foram aplicados às linhagens acima. O primeiro ciclo compreendeu uma abordagem para diversificação de CDRH1 e CDRH2, enquanto no segundo

ciclo, aplicou-se uma abordagem de mutagênese em CDRH3.

[00416] Abordagem de CDRH1 e CDRH2: A CDRH3 de um único anticorpo foi recombinada com uma biblioteca pré-obtida com variantes de CDRH1 e CDRH2 com uma diversidade de 1 x 10^8. Seleções foram então realizadas com uma rodada de MACS e quatro rodadas de FACS como descrito para a verificação de virgens.

[00417] Na primeira rodada de FACS, as bibliotecas foram separadas pela ligação a TIGIT monomérico 1 nM. A segunda rodada de FACS foi uma rodada de depleção com PSR para reduzir a poliespecificidade. As duas rodadas finais foram rodadas de seleção positiva usando o Fab ou IgG original para pressão por alta afinidade. A pressão por Fab/IgG foi realizada como segue: o antígeno foi incubado com dez vezes mais do parental Fab ou IgG original, e então, incubado com as bibliotecas de leveduras. As seleções enriqueceram IgGs com afinidades melhores do que o Fab ou IgG original. A reatividade cruzada entre as espécies foi verificada nas duas últimas rodadas de FACS.

[00418] Mutagênese em CDRH3: Geraram-se bibliotecas com diversificação de CDRH3 por posições distribuídas aleatoriamente em CDRH3. As seleções foram realizadas com uma rodada de MACS e três rodadas de FACS como descrito anteriormente. Seleções por PSR negativo, reatividade cruzada entre espécies, pressão por afinidade e separação foram realizadas visando obter uma população com as características desejadas.

Medições de K_D em MSD-SET

[00419] Medições da afinidade no equilíbrio foram realizadas em geral como descrito anteriormente (Estep *et al*., *supra*). Resumidamente, foram realizadas titulações da solução no equilíbrio (SET) em PBS + BSA livre de IgG 0,1% (PBSF) com o monômero TIGIT humano-His biotinilado mantido constante a 50 pM que foram incubadas com diluições em série de 3 a 5 vezes do anticorpo, iniciando por volta de 5 nM. Os anticorpos (20 nM em PBS)

foram revestidos sobre placas padrão ligação MSD-ECL durante a noite a 4 ºC ou à temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram então bloqueadas com BSA 1% por 30 minutos com agitação a 700 rpm, seguido por três lavagens com tampão de lavagem (PBSF + Tween 20 0,05%). As amostras SET foram aplicadas e incubadas nas placas por 150 segundos com agitação a 700 rpm, seguido por uma lavagem. O antígeno capturado em uma placa foi detectado com estreptavidina marcada com sulftotag 250 ng/mL em PBSF por incubação na placa por 3 minutos. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e depois ligadas em um instrumento MSD Sector Imager 2400 usando 1x Tampão T de leitura com tensoativo. A porcentagem de antígeno livre foi traçada em função de anticorpo titulado no Prism e ajustada a uma equação quadrática para extrair a K_D. Para melhorar o rendimento, robôs para o manuseio de líquidos foram utilizados durante os experimentos MSD-SET, incluindo a preparação de amostras SET.

[00420] A ligação dos anticorpos otimizados a TIGIT humano com etiqueta His, TIGIT cyno-Fc e TIGIT de camundongo-Fc foi medida usando o sistema ForteBio como descrito acima. Os anticorpos otimizados foram também testados quanto ao bloqueio de ligantes em um ensaio de competição com o ligante CD155 e quanto à ligação a linhagens de células HEK-TIGIT humano, HEK-TIGIT cyno, HEK-TIGIT de camundongo e células HEK originais, como descrito acima.

[00421] Os dados sobre afinidade dados sobre ligação às células para os anticorpos otimizados para afinidade são mostrados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Dados sobre afinidade e ligação celular de anticorpos otimizados para afinidade

Índice do clone	ForteBio IgG K_D TIGIT humano-His (M) Monovalente	ForteBio IgG K_D Cyno TIGIT-Fc (M) Avid	ForteBio IgG K_D Murina TIGIT-Fc (M) Avid	MSD IgG K_D (M) TIGIT humano-His	Ligação celular a célula HEK-TIGIT humano (FOB, número de vezes em relação ao fundo)	Ligação celular a célula HEK-TIGIT cyno (FOB, número de vezes em relação ao fundo)	Ligação celular a célula HEK-TIGIT de camundongo (FOB, número de vezes em relação ao fundo)
2	8,18E-09	1,34E-09	1,76E-09	NA	158	162	73
2C	5,18E-10	9,84E-10	3,92E-10	1,60E-11	193	224	100
13	2,63E-09	1,04E-09	3,41E-10	NA	212	224	119
13A	6,27E-10	1,12E-09	3,70E-10	2,50E-11	206	240	115
13B	6,10E-10	1,05E-09	3,30E-10	5,30E-12	201	235	102
13C	5,63E-10	1,07E-09	3,29E-10	8,60E-12	194	281	116
13D	5,71E-10	1,16E-09	3,64E-10	5,00E-12	190	245	116
16	2,52E-09	4,67E-09	9,07E-09	NA	192	27	19
16C	9,11E-10	4,25E-09	8,01E-10	6,30E-12	208	157	99
16D	5,96E-10	1,15E-09	2,63E-09	1,30E-11	199	241	63
16E	7,78E-10	1,36E-09	3,70E-09	1,10E-11	195	186	56
25	1,27E-09	1,50E-09	9,67E-10	NA	205	247	117
25A	1,10E-09	1,64E-09	8,23E-10	1,80E-11	207	238	119
25B	1,16E-09	1,40E-09	7,19E-10	2,20E-11	222	291	129
25C	6,97E-10	1,24E-09	4,94E-10	5,60E-12	216	286	124
25D	8,46E-10	1,18E-09	5,80E-10	2,70E-11	225	272	137
25E	8,51E-10	1,18E-09	5,66E-10	1,30E-11	204	252	116

Exemplo 9: Mapeamento de epítopos

[00422] Os epítopos de dois dos anticorpos monoclonais aqui revelados, Clone 13 e Clone 25, foram distinguidos por arranjo de peptídeos. Para reconstrução de epítopos da molécula alvo, uma biblioteca de mímicos de epítopos com base em peptídeos foi sintetizada usando síntese em fase sólida-Fmoc. Um suporte de polipropileno funcionalizado com amino foi obtido por enxerto de uma formulação de polímero hidrofílico de propriedade exclusiva, seguido por reação com t-butiloxicarbonil-hexametilenodiamina (BocHMDA) usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) com N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e clivagem subsequente dos grupos Boc com ácido trifluoroacético (TFA). A síntese padrão de Fmoc-peptídeos foi empregada para sintetizar peptídeos no suporte sólido funcionalizado com amino por estações de manuseio de líquidos JANUS modificadas sob medida (Perkin Elmer).

[00423] A síntese de mímicos estruturais foi realizada utilizando a tecnologia de propriedade exclusiva *Chemically Linked Peptides on Scaffolds* (CLIPS) (Pepscan). A tecnologia CLIPS permite estruturar peptídeos em alças únicas, alças duplas, alças triplas, dobramentos do tipo filha, dobramentos do tipo hélice e combinações dos mesmos. Moldes CLIPS são acoplados a resíduos de cisteína. As cadeias laterais de múltiplas cisteínas nos peptídeos são acopladas a um ou dois moldes CLIPS. Por exemplo, uma solução 0,5 mM do P2 CLIPS (2,6-bis(bromometil)piridina) é dissolvida em bicarbonato de amônio (20 mM, pH 7,8)/acetonitrila (1:3(v/v)). Essa solução é adicionada aos arranjos de peptídeos. O molde CLIPS se ligará às cadeias laterais de duas cisteínas se presentes nos peptídeos ligados à fase sólida dos arranjos de peptídeos (placa de 455 poços com poços de 3 µL). Os arranjos de peptídeos são gentilmente agitados na solução por 30 a 60 minutos enquanto completamente cobertos em solução. Finalmente, os arranjos de peptídeos são lavados extensamente com H_2O em excesso e sonicados em tampão de

ruptura contendo SDS 1%/beta-mercaptoetanol 0,1% em PBS (pH 7,2) a 70 ºC por 30 minutos, seguido por sonicação em H_2O por outros 45 minutos. Os T3 CLIPS carregando peptídeos foram produzidos de maneira semelhante, mas com três cisteínas.

[00424] Conjuntos diferentes de peptídeos foram sintetizados de acordo com os desenhos seguintes. O Conjunto 1 compreendia um conjunto de peptídeos lineares com comprimento de 15 aminoácidos derivados da sequência alvo de TIGIT humano com uma diferença (*offset*) de um resíduo. O Conjunto 2 compreendia um conjunto de peptídeos lineares do Conjunto 1, mas com os resíduos nas posições 10 e 11 substituídos por Ala. Quando uma Ala nativa ocorria em qualquer uma das posições, ela era substituída por Gly. O Conjunto 3 compreendia um conjunto de peptídeos lineares do Conjunto 1, que continha resíduos Cys. Nesse conjunto, as Cys nativas foram substituídas por Cys-acetamidometila ("Cys-acm"). O Conjunto 4 compreendia um conjunto de peptídeos lineares com comprimento de 17 aminoácidos derivados da sequência alvo de TIGIT humano com uma diferença de um resíduo. Nas posições 1 e 17, estavam resíduos Cys usados para criar mímicos em alça por meio de mP2 CLIPS. Cys nativas foram substituídas por Cys-acm. O Conjunto 6 compreendia um conjunto de peptídeos lineares com comprimento de 22 aminoácidos derivados da sequência alvo de TIGIT humano com uma diferença de um resíduo. Resíduos nas posições 11 e 12 foram substituídos pelo motivo "PG", enquanto resíduos Cys foram colocados nas posições 1 e 22 para criar um mímico restrito com mP2. Resíduos Cys nativos foram substituídos por Cys-acm. O Conjunto 7 compreendia um conjunto de peptídeos lineares com comprimento de 27 aminoácidos. Nas posições 1-11 e 17-27, estavam sequências peptídicas 11-mer derivadas da sequência alvo e unidas através do *linker* "GGSGG" (SEQ ID NO: 309). Foram feitas combinações com base nas informações UniProt sobre pontes dissulfeto para TIGIT humano. O Conjunto 8 compreendia um conjunto de

peptídeos combinatórios com comprimento de 33 aminoácidos. Nas posições 2-16 e 18-32, estavam peptídeos 15-mer derivados da sequência alvo de TIGIT humano. Nas posições 1, 17 e 33, estavam resíduos Cys usados para criar mímicos descontínuos por meio de T3 CLIPS.

[00425] A ligação do anticorpo a cada um dos peptídeos sintetizados foi testada por um ensaio ELISA com base em *pepscan*. Os arranjos de peptídeos foram incubados com a solução do anticorpo primário (durante a noite a 4 ºC). Depois de lavados, os arranjos de peptídeos foram incubados com uma diluição 1/1000 de um conjugado de cabra anti-HRP humano (Southern Biotech) por uma hora a 25 ºC. Após a lavagem, foram adicionados o substrato da peroxidase, sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) e 20 µL/mL de H_2O_2 3 por cento. Depois de uma hora, o desenvolvimento de cor foi medido. O desenvolvimento de cor foi quantificado com uma câmera com dispositivo de carga acoplada (CCD) e um sistema de processamento de imagens. Os valores obtidos pela câmera CCD variam de 0 a 3000 mAU, semelhantes a um leitor padrão de ELISA em placa com 96 poços.

[00426] Para verificar a qualidade dos peptídeos sintetizados, um conjunto separado de peptídeos de controle positivo e negativo foi sintetizado em paralelo. Esses eram os anticorpos comerciais rastreados 3C9 e 57.9 (Posthumus *et al., J. Virol.*, 1990, 64:3304–3309).

[00427] Em relação ao Clone 13, quando testado sob condições de alto rigor, o Clone 13 ligou-se fracamente a mímicos de epítopos descontínuos. O anticorpo foi também testado sob condições de rigor moderado, foi observada ligação detectável do anticorpo. As maiores intensidades do sinal foram registradas com mímicos de epítopos descontínuos contendo os trechos do núcleo $_{68}$ICNADLGWHISPSFK$_{82}$ (SEQ ID NO: 258), $_{42}$ILQCHLSSTTAQV$_{54}$ (SEQ ID NO: 298), $_{108}$CIYHTYPDGTYTGRI$_{122}$ (SEQ ID NO: 299). Além disso, foi observada ligação mais fraca com

peptídeos contendo o trecho peptídico $_{80}$SFKDRVAPGPG$_{90}$ (SEQ ID NO: 300). A ligação do anticorpo a mímicos de epítopos lineares e conformacionais simples foi em geral menor e observada apenas para os motivos $_{68}$ICNADLGWHISPSFK$_{82}$ (SEQ ID NO: 258), $_{108}$CIYHTYPDGTYTGRI$_{122}$ (SEQ ID NO: 299) e $_{80}$SFKDRVAPGPG$_{90}$ (SEQ ID NO: 300).

[00428] Em relação ao Clone 25, quando testado sob condições de alto rigor, o Clone 25 ligou-se detectavelmente a peptídeos de todos os conjuntos. A ligação mais forte foi observada com mímicos de epítopos descontínuos. Embora a ligação a peptídeos contendo resíduos dentro do trecho $_{68}$ICNADLGWHISPSFK$_{82}$ (SEQ ID NO: 258) fosse também observada em outros conjuntos, a ligação ao trecho peptídico $_{50}$TTAQVTQ$_{56}$ (SEQ ID NO: 301) foi somente observada em combinação com $_{68}$ICNADLGWHISPSFK$_{82}$ (SEQ ID NO: 258). Além disso, foi também observada ligação mais fraca com peptídeos contendo o trecho peptídico $_{80}$SFKDRVAPGPGLGL$_{93}$ (SEQ ID NO: 300).

[00429] Com base nos resultados desse mapeamento de epítopos para o Clone 13 e o Clone 25, o mapeamento fino dos epítopos do Clone 13 e do Clone 25 foi realizado utilizando os métodos descritos acima, usando os seguintes conjuntos de peptídeos. O Conjunto 1 compreendia uma biblioteca de mutantes de epítopos de resíduo único baseados na sequência CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302). os resíduos ADHIQRY (SEQ ID NO: 304) foram submetidos à substituição. As posições 1, 17, 19, 30 e 33 não foram substituídas. Resíduos Cys nativos foram substituídos por Cys-acm (indicado por “2” por toda parte). O Conjunto 2 compreendia uma biblioteca de mutantes Ala duplo móveis derivados da sequência CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302). AS posições 1, 17 e 33 não foram substituídas. Resíduos Cys nativos foram substituídos por Cys-acm. O Conjunto 3 compreendia uma biblioteca

de mutantes de epítopos de resíduos únicos com base na sequência CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303). Os resíduos ADHIQRY (SEQ ID NO: 304) foram usados para a substituição. As posições 1, 2, 17, 19, 30 e 33 não foram substituídas. O Conjunto 4 compreendia uma biblioteca de mutantes Ala duplo móveis derivados da sequência CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303). As posições 1, 17 e 33 não foram substituídas.

[00430] O Clone 13 foi testado com quatro séries de mutantes de epítopos descontínuos derivados dos peptídeos CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302) e CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303) sob condições de alto e moderado rigor. A análise de dados indicou que, em todos os casos, as substituições de resíduos $_{81}$FK$_{82}$ quer com resíduos únicos ou com Ala duplo prejudicou a ligação do Clone 13. Mutações únicas de outros resíduos dentro de mímicos de epítopos descontínuos não tiveram efeitos drásticos sobre a ligação. Por outro lado, mutantes de epítopos de Ala duplo exibiram um efeito mais pronunciado sobre a ligação quando comparados com a série de mutantes de resíduos únicos dos mímicos descontínuos correspondentes. Verificou-se também que as substituições de Ala duplo dos resíduos $_{51}$TAQVT$_{55}$ (SEQ ID NO: 305) dentro de CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302) afetaram notavelmente a ligação do Clone 13. As intensidades do sinal para o Clone 13 com mímicos de epítopos derivados da sequência CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303) foram menores do que aquelas registradas com CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302). Foi ainda verificado que, além de $_{81}$FK$_{82}$, substituições de Ala duplo de $_{74}$GWHI$_{77}$ (SEQ ID NO: 306) reduziram notavelmente a ligação do Clone 13. Além disso, mutações de Ala duplo dentro do trecho $_{87}$PGPGLGL$_{93}$ (SEQ ID NO:

307) enfraqueceu um pouco a ligação.

[00431] O Clone 25 foi testado em quatro séries de mutantes de epítopos descontínuos derivados dos peptídeos CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302) e CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303) sob condições de alto e moderado rigor. A análise de dados coletados de conjuntos individuais de mutantes de epítopos indicou que substituições únicas e duplas de resíduos $_{81}$FK$_{82}$ afetou drasticamente a ligação. Substituições de um único resíduo por outros outro resíduos dentro de CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302) e CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303) não causaram uma diminuição notável em intensidades do sinal. Diversos mutantes de Ala duplo móvel exibiram efeitos mais pronunciados na ligação do Clone 25 ao mímico. Além de $_{81}$FK$_{82}$, substituições de Ala duplo dos resíduos $_{52}$AQ$_{53}$ e P79 também afetou levemente a ligação do anticorpo a mímico do epítopo CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 302). A análise da ligação do Clone 25 à série de mutante Ala duplo derivado de CKDRVAPGPGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO: 303) confirmou mais uma vez a importância de $_{81}$FK$_{82}$, mas também indicou que substituições de Ala duplo dos resíduos $_{73}$LGW$_{75}$ e $_{82}$KDRVA$_{86}$ (SEQ ID NO: 308) afetaram moderadamente a ligação.

[00432] Em suma, para os anticorpos monoclonais Clone 13 e Clone 25, verificou-se que os resíduos $_{81}$FK$_{82}$ eram fundamentais para a ligação de ambos os anticorpos a mímicos do epítopo de TIGIT. Em relação ao Clone 13, verificou-se também que os resíduos $_{51}$TAQVT$_{55}$ (SEQ ID NO: 305), $_{74}$GWHI$_{77}$ (SEQ ID NO: 306) e $_{87}$PGPGLGL$_{93}$ (SEQ ID NO: 307) contribuem para a ligação. Em relação ao Clone 25, foi verificado também que os resíduos $_{52}$AQ$_{53}$, $_{73}$LGW$_{75}$, P79 e, $_{82}$KDRVA$_{86}$ (SEQ ID NO: 308) contribuem para a ligação.

Exemplo 10: Anticorpos anti-TIGIT com cadeia principal alterada

[00433] A fim de melhorar potencialmente a geração atual de anticorpos anti-TIGIT, um anticorpo anti-TIGIT afucosilado e uma versão mutada com Fc de um anticorpo anti-TIGIT com função efetora reduzida (IgG1 LALA-PG) foram desenvolvidos. Prevê-se que os anticorpos afucosilado e LALA-PG ainda bloquearão as interações de CD155 e CD112 com TIGIT. Sem a intenção de ficar preso a qualquer teoria em particular, foi levantada a hipótese de que um anticorpo anti-TIGIT afucosilado pode ligar-se diretamente a Tregs infiltrados no tumor e levar a maior ADCC e/ou ADCP mediadas por FC e, no final, suscitar uma resposta imune antitumoral maior ou, alternativamente, que a função efetora poderia levar à depleção de células T efetoras, assim, um anticorpo efetor nulo pode permitir a conservação de células T CD8 ativadas.

DNA e geração de vetor (Genewiz):

[00434] Sequências de domínios variáveis e constantes de anticorpos são sintetizados usando PCR sem molde. A sequência virtual do gene é convertida em sequências de oligonucleotídeos utilizando a ferramenta de bioinformática de Genewiz. Oligonucleotídeos são sintetizados, agrupados e amplificados por meio de PCR. O amplicon inteiro, resultante da reação PCR, é clonado no vetor e o produto é então transformado em *E. coli* e colônias únicas são isoladas. As colônias são cultivadas durante a noite em meio líquido e DNA plasmidial isolado, purificado e sua sequência é verificada pelo sequenciamento de Sanger. Cadeias leves e cadeias pesadas são clonadas em vetores pcDNA3.4.

Expressão de anticorpos (Seattle Genetics):

[00435] Em proporção 1:1, vetores de cadeia pesada e cadeia leve de anticorpos são diluídos no meio ThermoFisher OptiPRO SFM com o reagente de transfecção ExpiFectamine CHO. O DNA/reagente de transfecção é então

adicionado a uma cultura ExpiCHO e meio ThermoFisher ExpiCHO Expression e cultivados por nove dias com reforçador ExpiCHO adicionado no dia um e alimentações de ExpiCHO adicionadas nos dias um e dois. Para produzir anticorpos com fucosilação do núcleo reduzida no glicano N297 (anticorpos afucosilados), o análogo da fucose 2-fluorofucose é adicionado à cultura ExpiCHO no dia anterior e no dia da transfecção. A cultura é coletada por centrifugação e filtração em 0,2 μm.

Purificação de anticorpos (Seattle Genetics):

[00436] Usam-se colunas GE HiTrap mAb Select SuRe para a purificação de cada IgG. Antes da eluição, a resina é lavada com 5CV de PBS+Triton 0,1%, 5CV de PBS+NaCl 0,5M e 7,5CV de PBS. A IgG é eluída com tampão de ácido acético 25 mM, pH3. A amostra tem o tampão trocado para PBS usando colunas 26/60 HiPrep Desalt. A amostra é entrada esterilizada com filtração antes de ser coletada para a caracterização. A caracterização inclui concentração A280, aSEC HPLC, aHIC HPLC e PLRP-MS glicosilada reduzida e desglicosilada (QToF).

Exemplo 11: Caracterização de anticorpos com cadeia principal alterada

[00437] *In vivo*, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK podem mediar ADCP (fagocitose mediada por células dependente de anticorpo) e ADCC (citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo via FcγRI, FcγRIIa, FcγRI e FcγRIIIa). Embora todos os três receptores possam participar em ADCP, acredita-se que FcγRIIIa seja o receptor Fcγ predominante envolvido em ADCC. A afucosilação de anticorpos IgG_1 resulta em ligação com maior afinidade ao FcγRIIIa e b e pode aumentar, assim, a atividade ADCC e ADCP.

[00438] Utilizou-se interferometria de bicamada (BLI) para avaliar a cinética de ligação de FcγRIIIa 158V humano a vários anticorpos anti-TIGIT a fim de entender os efeitos de anticorpos afucosilados e das mutações

LALA-PG a 30 ºC. Uma proteína de fusão N-hidroxissuccinimida (NHS)-éster de FcγRIIIa 158V humano biotinilado-mono Fc N297A (expressa na Seattle Genetics) foi carregada em biossensores de estreptavidina de alta precisão (Pall ForteBio) a 3 μg/mL por 300 segundos, após uma verificação do sensor por 300 segundos. Depois de um basal de 200 segundos, anticorpos anti-TIGIT titulados foram associados por 50 segundos e dissociados por 200 segundos. Antes da análise, as referências foram subtraídas em cada ensaio. Os dados foram corrigidos com um alinhamento do eixo Y no início da associação, uma correção da dissociação entre etapas e filtragem de Savitzky-Golay. Um modelo 1:1 do modelo de ajuste global isotérmico de Langmuir foi usado para ajuste das curvas.

[00439] Dados representativos são mostrados na Figura 10. Os sensogramas para as variantes hIgG1 de TIGIT foram semelhantes aqueles que haviam sido observados para ligação de hFcγRIIIa por BLI: IgG1 do tipo selvagem no intervalo 100-200 nM e IgG1 afucosilado cerca de 10-20 nM devido a um aumento de 10 vezes na k_{on} causado por uma entalpia aumentada ou interações aumentadas entre hFcγRIIIa e hIgG1. hIgG1 LALA-PG não exibiu ligação quantificável, mesmo na concentração mais alta de 5000 nM. Os resultados são resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de ajuste global da ligação de anticorpos anti-TIGIT a FcγRIIIa 158V humano por BLI usando um modelo isotérmico 1:1 de Langmuir

Ab	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	RMax	Req/ Rmax (%)	Total X^2	Total R^2
Clone13C hIgG1 anti-TIGIT	2,53E-07	1,46E+05	3,71E-02	0,57	89-67	0,18	0,9931
Clone13 hIgG1 anti-TIGIT	3,7E-07	1,29E+05	4,80E-02	0,47	84-5	0,16	0,9900
Clone13 hIgG1 afucosilado anti-TIGIT	1,35E-08	7,31E+05	9,85E-03	0,62	88-6	0,024	0,9993
Clone13 hIgG1 LALA-PG anti-TIGIT	NB*	-	-	-	-	-	-

*NB (sem ligação). Nenhuma ligação observável de hFcγRIIIa 158V ao Clone13 hIgG1 LALA-PG anti-TIGIT em concentrações de 20 μM

[00440] Para avaliar o impacto da modificação por Fc de anticorpos anti-TIGIT sobre a atividade antitumoral, foram produzidos anticorpos quiméricos compostos por CDRs humanas e cadeia principal (*backbone*) de IgG2a murina em versões do tipo selvagem ou com as modificações de afucosilado ou LALA-PG. A afucosilação de anticorpos IgG2a murinos é semelhante à produção da cadeia principal de IgG1 humana afucosilada e resulta em ligação aumentada ao FcγRIV murino, o receptor cognato ao FcγRIV humano. Para avaliar a extensão da ligação alterada ao FcγRIV, a afinidade do anticorpo pelo FcγRIV expresso em células CHO foi determinada por FACS por meio de FITC de anti-IgG de camundongo. Como mostrado na Figura 12, o clone 13 mIgG2a não fucosilado ligou-se em medida significativamente maior a ambas a cadeia principal do tipo selvagem ou modificada LALA-PG. O clone 13 mIgG2a afucosilado ligou-se com uma afinidade de K_D 2,37 nM quando comparado ao clone 13 mIgG2a do tipo selvagem, que se ligou com K_D de 33,4.

Exemplo 12: Expressão de TIGIT em subconjuntos de células T em células T de doadores sadios

[00441] A expressão de TIGIT em subconjuntos de células T em doadores sadios foi avaliada por citometria de fluxo. PBMC congeladas de 12 doadores sadios foram adquiridas da Astarte Biologics (Bothell, Washington) e Folio Conversant (Huntsville, Alabama). As idades dos doadores variavam de 21 a 74 com idade mediana de 48 anos. As células foram coradas com um corante de viabilidade e os seguintes anticorpos anti-humanos após bloqueio de receptores Fc: CD3, CD96, CD226, CCR7, CD25, CD127, CD45RA, CD8, CD4, CD226, CD155 (Biolegend) e TIGIT (eBioscience). As células coradas foram então analisadas em um citômetro de fluxo Attune Nxt (Life Technologies). Subconjuntos de Treg foram definidos pela expressão adequada de CD4, CD25 e CD127 ($CD4^+CD25^+CD127^{lo}$). Suconjuntos de células $CD4^+$ e $CD8^+$ efetoras de memória (T_{EM}; $CD45RA^-CCR7^-$),

CD45RA+ efetoras de memória ($T_{EMRA;}$ $CD45RA^{+}CCR7^{-}$), de memória central ($T_{CM;}$ $CD45RA^{-}CCR7^{+}$) e virgens ($T_{N;}$ $CD45RA^{+}CCR7^{+}$) foram definidos de acordo com a expressão de CD45RA e CCR7. Como mostrado na Figura 3, a expressão de TIGIT é maior em Tregs, enquanto a expressão do receptor CD226 ativador é menor em subconjuntos de células T CD8 de memória e virgens e mostra níveis semelhantes aos suconjuntos de células T CD4 virgens. A expressão de CD155 é praticamente ausente entre células T, mas foi vista em células apresentadoras de antígeno.

Exemplo 13: Clone 13 do anticorpo anti-TIGIT impulsiona a depleção de Tregs

[00442] Para avaliar o efeito de anticorpos anti-TIGIT sobre o número absoluto de Tregs e de outros subconjuntos de células T em PBMC normais, PBMCs de doador sadio de um doador expressando os alelos V/F do receptor FcγRIII (Astarte Biologics) foram isoladas. As células foram cultivadas na presença das versões do tipo selvagem, LALA-PG ou afucosilada do clone 13 do anticorpo anti-TIGIT ou uma IgG1 humana de isótipo controle (Biolegend) em várias concentrações. PBMCs crioconservadas (Astarte Biologics) foram incubadas em RPMI 1640 com FBS 10% em uma placa de fundo redondo com 96 poços a 37 ºC. $2{,}5x10^{5}$ PBMC foram plaqueadas por poço em três réplicas por poço com uma titulação de anticorpos anti-TIGIT ou controle. Depois de 24 horas, as células foram lavadas, o bloqueio do receptor Fc foi realizado e as células foram coradas com um corante de viabilidade e os seguintes anticorpos anti-humano: CD3, CD4, CD8, CD25, CD127 e CD45RA (Biolegend). As células coradas foram analisadas em um citômetro de fluxo Attune NxT e subconjuntos de células T foram distinguidos como descrito acima. Como mostrado na Figura 14, Tregs eram 73% positivas para TIGIT no início do ensaio. Depois de 24 horas em cultura, a versão do tipo selvagem do anticorpo clone 13 IgG1 (círculo preenchido de preto) provocou uma diminuição dose- dependente em Tregs TIGIT-positivas, com a depleção

máxima ocorrida a 1 μg/mL. A versão afucosilada do clone 13 (quadrado preenchido de preto) conferiu maior atividade com a depleção máxima de Treg ocorrida a 200 pg/mL. A versão LALA-PG do clone 13 (triângulo preenchido de preto) e a IgG1 humana de isótipo controle (triângulo invertido cinza) não mostraram atividade evidente nesse ensaio.

[00443] Além de avaliar as versões do tipo selvagem, afucosilada e LALA-PG do anticorpo clone 13 anti-TIGIT, uma versão foi preparada compreendendo uma região constante de IgG1 com as mutações S293D/A330L/I332E ("DLE") que, segundo relatado, reforçam a afinidade por receptores Fcɣ. Ver Lazar, 2006, *PNAS* 103: 4005-4010. A versão do tipo selvagem, afucosilada, LALA-PG e DLE do clone 13 foram avaliadas quanto à depleção de Tregs substancialmente como descrito acima em PBMCs de doador sadio de um doador expressando os alelos V/V de alta afinidade do receptor FcγRIII.

[00444] Como mostrado na Figura 35, o anticorpo clone 13 IgG1 do tipo selvagem (triângulos) depletou Tregs com IC50 de ~ 0,024 μg/ml, enquanto ambos os anticorpos, o clone 13 IgG1 DLE (quadrados) e o clone 13 IgG1afucosilado (círculos) depletaram Tregs com potência muito maior, com IC50s de 0,0006 μg/mL e 0,0005 μg/mL, respectivamente (Na Figura 35, os dados da IgG1 do tipo selvagem são de um experimento anterior usando PBMCs do mesmo doador).

[00445] Outro anticorpo anti-TIGIT, H5/L4 IgG1 (ver WO 2016/028656 A1), foi também testado quanto a sua capacidade para depletar Tregs de PBMCs de doador sadio de um doador expressando os alelos V/V de alta afinidade do receptor FcγRIII. Como mostrado na Figura 36, o anticorpo clone 13 IgG1 afucosilado foi o mais potente em induzir a depleção de Tregs, enquanto os dois anticorpos IgG1 do tipo selvagem mostraram potências e curvas de depleção muito semelhantes (Na Figura 36, os dados do clone 13 IgG1 do tipo selvagem são de um experimento anterior usando PBMCs do

mesmo doador).

Exemplo 14: Avaliação da depleção de Tregs em uma cocultura de NK/Treg alogênica

[00446] Para examinar a potencial citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) em uma cocultura de células Treg/NK, células T $CD4^+CD25^+$ humanas crioconservadas (Stem Cell Technologies) foram descongeladas e estimuladas com partículas CD3/CD28 MACS iBead (Miltenyi Biotec) em proporção 1:2 de esfera:célula em meio RPMI e FBS 10% suplementado com IL-2 humana recombinante 20 ng/mL (R&D systems) por 3 dias para aumentar a expressão de TIGIT. Depois de 3 dias, as células Treg foram avaliadas quanto à expressão de TIGIT na superfície celular por citometria de fluxo e verificou-se que eram ~40% positivas. As células Treg foram então lavadas e marcadas com CFSE (Life Technologies) para distingui-las de células NK após a cocultura. Naquele mesmo dia, células NK humanas purificadas (Astarte Biologics) foram descongeladas e pré-ativadas por 2 horas na presença de IL-2 200 ng/mL. Uma cocultura de células NK cells e Treg em proporção 2,5:1 de NK:Treg foi estabelecida em uma placa de 96 poços na presença de IL-2 100 ng/mL em RPMI 1640 com FBS 10%. As células foram incubadas a 37 ºC com as versões do tipo selvagem, LALA-PG ou afucosilada do clone 13 de anticorpo anti-TIGIT ou uma IgG1 humana de isótipo controle (Biolegend) em três réplicas por poço, ou um anticorpo anti-OKT9 afucosilado, que serviu como controle positivo. Depois de 24 horas, as células foram lavadas, coradas com um corante de viabilidade e analisadas por FACS em um citômetro de fluxo Attune Nxt. Tregs foram identificadas e enumeradas de acordo com o corante de viabilidade e coloração CFSE.

[00447] Os resultados são mostrados na Figura 15. Os níveis de Treg caíram pelo tratamento com o clone 13 IgG1 do tipo selvagem (círculos pretos), demonstrando que a depleção pode ser, em parte, decorrente de

ADCC direta mediada por NK. A capacidade do clone 13 IgG1 do tipo selvagem para depletar células T pareceu máxima a 1 μg/mL de tratamento. A proporção da depleção de Treg foi mais substancial com a versão afucosilada do clone 13 IgG1 (quadrados pretos), com atividade máxima aparecendo a 40 ng/mL. A versão LALA-PG efetora nula do clone 13 IgG1 (triângulos pretos) e a IgG1 humana de isótipo controle (triângulos cinzas invertidos) não mostraram efeito evidente em números de Treg, enquanto o anticorpo SEA contra OKT19 de controle positivo (círculos claros) mostraram a depleção maior. Os resultados são compatíveis com os dados sobre a expressão de TIGIT (Figura 4) que mostraram que Tregs expressaram níveis elevados de TIGIT.

Exemplo 15: Anticorpo anti-TIGIT induz produção de citocinas

[00448] Além da ligação com maior afinidade a FcγRIIIa em células NK e impulsionar ADCC, os anticorpos afucosilados também se ligam com maior afinidade a FcγRIIIa e FcγRIIIb em células apresentadoras de antígeno e neutrófilos e podem reforçar ADCP e a ativação de células apresentadoras de antígeno.

[00449] Para investigar o impacto do anticorpo anti-TIGIT e variantes Fc em células apresentadoras de antígeno, PBMCs foram isoladas como segue. O sangue de 3 doadores humanos únicos foi coletado em tubos heparinizados e, dentro de aproximaamente quatro horas da coleta, dividido em alíquotas em tubos cônicos de 50 mL (Falcon) e centrifugados a 200 g em um Eppendorf 5810R (rotor A-4-62) por 20 minutos a 25 ºC sem freios, a fim de separar a fração rica em plaquetas. Após a centrifugação, três camadas distintas formaram-se: camada inferior, eritrócitos (responsável por 50-80% do volume total); camada do meio, faixa muito fina de leucócitos (também chamada "*buffy coat*" [papa leucocitária]); camada superior, plasma rico em plaquetas de cor palha (PRP). A camada superior na cor palha, que é

enriquecida com plaquetas, foi removida com uma pipeta de 1 mL e descartada. Uma vez removido plasma rico em plaquetas as demais frações foram diluídas com volumes iguais de PBS estéril (Gibco). 15 mL de Histopaque-1077 (Sigma) aquecido até a temperatura ambiente foi espalhado em uma camada inferior abaixo das frações diluídas. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 25 minutos a 25 ºC sem freios. Após a centrifugação, três camadas formaram-se novamente: camada inferior, eritrócitos (responsável por 50-80% do volume total); camada do meio, faixa espessa de leucócitos; camada superior, PBS e plaquetas restantes. A camada de PBS/plaqueta foi removida com uma pipeta de 1 mL e descartada. A faixa espessa de leucócitos foi gentilmente removida e colocada em um tubo cônico estéril limpo de 50 mL. Os tubos foram cheios até 50 mL e as células centrifugadas a 800 g por 10 minutos. A solução de lavagem foi removida e os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de tampão de lise ACK red blood (Gibco) por dez minutos. 35 mL de PBS estéril foram adicionados e as células centrifugadas a 800 g por 10 minutos. A solução de lavagem foi removida e o *pellet* ressuspenso em 50 mL de PBS. 500 μL de amostra foram removidos e as PBMC foram contadas com um Vi-cell-XR (Beckman Coulter). As células foram centrifugadas mais uma vez a 800 g por dez minutos.

[00450] As células foram ressuspensas a 1 milhão de células/mL em DMEM completo contendo FBS 10% inativado pelo calor (Atlantica Biologics) e 1X penicilina/strepA e 1X glutamina e espalhadas a 100.000 células/poço em uma placa com 96 poços. PBMCs foram expostas a concentrações crescentes (10; 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0.0001 ou 0 μg/mL) do clone 13 IgG1 do tipo selvagem, do clone 13 IgG1 afucosilado ou do clone 13 IgG1 LALA-PG por 24 horas. Os sobrenadantes da cultura de tecido foram coletados e processados para produção de citocinas usando um Luminex multiplex (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

[00451] Os resultados são mostrados na Figura 16. O tratamento de

PBMCs com o anticorpo clone 13 IgG1 do tipo selvagem (quadrados pretos) e o anticorpo clone 13 IgG1 afucosilado (losangos pretos) resultou na produção de citocinas inflamatórias, incluindo aquelas associadas com ativação de monócitos/macrófagos tais como MCP1, IL-8 e MIP1α. A exposição das células ao clone 13 IgG1 afucosilado provocou uma resposta mais forte citocinas, enquanto a forma LALA-PG Fc eftora nula resultou em produção muito mínima de citocinas.

Exemplo 16: Anticorpo anti-TIGIT induz ativação de marcadores em APCs

[00452] Para avaliar o efeito de anticorpo anti-TIGIT em células apresentadoras de antígeno presentes nas PBMCs, a expressão de moléculas coestimuladoras foi avaliada nos *pellets* celulares restantes da análise de citocinas descrita acima. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em 50 mL de tampão BD FACS e transferidos para placas de microtitulação de fundo redondo com 96 poços. Os receptores Fc foram bloqueados com fragmentos de Fc humano 100 μg/mL (Millipore) por 30 minutos em gelo. Uma mistura máster composta por anticorpo anti-CD14 (BD), anticorpo anti-CD86 (BD) e anticorpo anti-MHCII (pan anti-DR, DP, DQ antibody, BD), diluídos a1:100, foi preparada em tampão BD FACS contendo fragmentos de Fc humano 100 mg/mL. Cinco μL da mistura máster foram adicinados a cada poço contendo 90 μL de células ressuspensas e as amostras foram incubadas por uma hora em gelo. As células foram então centrifugadas a 400 g em uma centrífuga Eppendorf 5810R pré-aquecida por cinco minutos. Os sobrenadantes foram removidos e as células lavadas com 200 μL de tampão BD FACS. As células foram lavadas duas vezes e então ressuspensas em 200 μL de tampão FACS. As amostras foram coletadas em um citômetro de fluxo LSRII (BD Biosciences) com o *software* DIVA (BD biosciences). A média da intensidade de fluorescência (MFI) e CD86 e MHCII em monócitos/macrófagos CD14+ foi analisada com o software FlowJo.

[00453] Os resultados desse experimento são mostrados na Figura 17. O tratamento de monócitos/macrófagos CD14+ com o clone clone 13 IgG1 do tipo selvagem ou com o clone 13 IgG1 afucosilado do anticorpo anti-TIGIT resultou na regulação positiva dos marcadores de ativação CD86 (painel à esquerda) e MHCII (painel à direita), indicando maturação de células apresentadoras de antígeno. O tratamento com o clone 13 IgG1 LALA-PG não aumentou a expressão de CD86 ou MHCII por células $CD14^{+}$.

Exemplo 17: Avaliação *in vivo* de anticorpos anti-TIGIT com afinidade diferenciada por Fc em modelos de tumor singênico

[00454] A eficácia antitumoral do anticorpo anti-TIGIT afucosilado *versus* o anticorpo anti-TIGIT de função efetora nula compreendendo a mutação LALA-PG foi investigada. Esse experimento foi delineado para determinar se a função efetora do anticorpo anti-TIGIT (reforçada na versão afucosilada e abolida na versão LALA-PG) está envolvida no mecanismo de ação antitumoral. Foram geradas versões murinas do clone 13 do anticorpo anti-TIGIT com três domínios Fc diferentes: 1) mIgG2a do tipo selvagem; 2) mIgG2a afucosilado; 3) mIgG2a LALA-PG (função efetora reduzida). Os anticorpos foram avaliados nos modelos de tumor singênico CT26 (cólon), A20 (linfoma de células B) e MC38 (cólon), with seis camundongos por grupo de anticorpo por modelo de tumor. Cada anticorpo foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) a uma dose de 5 mg/kg fornecida a cada três dias, totalizando seis doses, assim que os tumores atingiam 100 mm^3. O comprimento e largura subcutâneos do tumor foram medidos com um paquímetro digital e o volume tumoral foi calculado usando a fórmula $V= (L \times W^2)/2$.

[00455] Os resultados desse experimento são mostrados na Figura 18. Cada linha representa a mediana do volume tumoral (mm^3) (N=6 por grupo). A Figura 18A mostra que o tratamento do modelo A20 (modelo de linfoma singênico) com os anticorpos anti-TIGIT clone 13 mIgG2a afucosilado, clone

13 mIgG2a do tipo selvagem e clone 13 mIgG2a LALA-PG resultou em 4/6, 2/6 e 0/6 respostas completas, respectivamente. A Figura 18B mostra que o tratamento do modelo CT26WT (carcinoma de cólon murino) com os anticorpos anti-TIGIT clone 13 mIgG2a afucosilado, clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e clone 13 mIgG2a LALA-PG resultou em 4/6, 3/6 e 0/6 respostas completas, respectivamente. A Figura 18C mostra que o tratamento do modelo MC38 (carcinoma de cólon murino) com os anticorpos anti-TIGIT clone 13 mIgG2a afucosilado, clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e clone 13 mIgG2a LALA-PG resultou em 1/6, 1/6 e 0/6 respostas completas, respectivamente.

[00456] A dicotomia nas respostas induzidas nos diferentes modelos singênicos é interessante à luz de seus perfis imunes diferenciais relatados. Os modelos dos tumores CT26 e A20 são relatados como mais altamente infiltrados por células NK e T, enquanto o modelo MC38 é conhecido por ser mais infiltrado por células supressoras de origem mieloide (Mosely, *et al*., 2017, *Canc. Immunol. Res*. 5(1): 29-41). A atividade aumentada dos anticorpos anti-TIGIT nos modelos dos tumores A20 e CT26 respalda a atividade moduladora de células T desses anticorpos e sugere que células T infiltradas podem servir como um biomarcador preditivo positivo para essa terapia. Coletivamente, esses dados demonstram que a atividade antitumoral *in vivo* de anticorpos anti-TIGIT murinos é dependente da função efetora de Fc e que a IgG2a afucosilada reforçou a eficácia quando comparada ao tipo selvagem.

Exemplo 18: Atividade combinatória de anticorpos anti-TIGIT

[00457] TIGIT é expresso não só em células T, mas também em células NK e apresentadoras de antígeno. Dado a expressão pleotrópica, a função de TIGIT pode potencialmente impulsionar atividade multifatorial e os anticorpos anti-TIGIT podem ter impacto sobre múltiplas funções celulares, incluindo, por exemplo, atividade ADCC de células NK, ativação de células T

e respostas ótimas de memória antigênica. Além da atividade de agente único, os anticorpos anti-TIGIT podem amplificar a atividade de células T, NK ou células apresentadoras de antígeno em combinação com outro agentes terapêuticos. TIGIT e CD226 são expressos em células NK e a expressão de TIGIT pode não só inibir ativamente a atividade ótima e o potencial para ADCC de células NK, mas pode também impedir a ativação mediada por CD226. O bloqueio de TIGIT pode, portanto, amplificar ADCC mediada por NK de agentes direcionados de humana IgG1 e agentes terapêuticos direcionados para ADCC podem mostrar atividade reforçada quando combinados com anticorpos anti-TIGIT.

[00458] Para investigar essa possibilidade, a linhagem celular de carcinoma pulmonar de não pequenas células, A549, foi radiomarcada com $Na_2[^{51}Cr]O_4$ (100 µCi adicionados às células), lavada e misturada com titulações de cetuximabe isoladamente, ou cetuximabe combinado com anticorpo anti-TIGIT clone 13 hIgG1 do tipo selvagem 10 µg/mL. Um isótipo controle a 10 µg/mL foi igualmente incluído no experimento. Células efetoras foram isoladas de PBMC crioconservadas de doador normal utilizando o kit EasySep Human NK Cell Enrichment (Stem Cell Technologies). As células do doador eram do genótipo FcγRIIIa 158 V/V. Células efetoras foram adicionadas em proporção 10:1 de efetora para célula alvo (50.000:5000). Após 4 horas de incubação, a radioatividade liberada no sobrenadante da cultura foi medida e o percentual de lise de células específicas foi calculado como (com da amostra em teste - com espontânea) / (com total - cmp espontânea) x 100. Os valores de cmp espontânea e total foram determinados a partir dos sobrenadantes de células alvo incubadas no meio apenas e de células alvo lisadas com Triton X-100 1%, respectivamente.

[00459] Como mostrado na Figura 19, o tratamento de células alvo A549 com o anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1 isoladamente não impulsionou a atividade ADCC, mas quando células alvo A549 foram

colocadas em contato com a combinação de cetuximabe e anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1, a atividade lítica máxima foi aumentada em relação àquela observada com cetuximabe isoladamente.

[00460] Além de modular a atividade NK, o bloqueio de TIGIT pode aumentar respostas de memória específicas ao antígeno em células T. Anticorpos direcionados para as proteínas de uma via de controle presentes em células T pode, portanto, mostrar atividade reforçada quando combinados com um anticorpo anti-TIGIT.

[00461] Para investigar essa possibilidade, realizaram-se ensaios de memória antigênica em resposta ao citomegalovírus (CMV). PBMCs humanas de um doador reativo ao CMV foram adquiridas da Astarte Bio. Células T de memória desse doador podem ser reativadas *in vitro* com antígeno de CMV para avaliar a sua resposta específica ao antígeno. PBMCs foram ressuspensas em X-vivo 10 (Lonza) contendo FBS 10% (Atlanta Biologics) e 100.000 células foram espalhadas em placas de fundo redondo com 96 poços. As células foram expostas a 10 μg/ml de antígenos de CMV na presença ou ausência de anticorpos anti-TIGIT e/ou anticorpos anti-PD-1 direcionados. Para avaliar a atividade combinatória, PBMCs foram tratadas com uma dose subótima de anticorpos anti-PD-1 (pembrolizumabe ou nivolumabe) a 1 μg/mL e foram adicionadas concentrações crescentes do anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1 do tipo selvagem (1 pg/mL a 1 μg/mL). A resposta de evocação da memória ao antígeno do CMV foi deixada prosseguir por 5 dias, depois dos quais, os sobrenadantes da cultura de tecido foram colhidos e as respostas de citocinas determinadas por avaliação no ensaio Luminex (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

[00462] Como mostrado na Figura 20, o anticorpo anti-TIGIT clone 13 IgG1 reforçou a secreção de IFNγ por PBMCs tratadas com anticorpos anti-PD-1 e expostas a antígenos do CMV, de maneira dose-dependente.

[00463] Para investigar a atividade combinatória *in vivo*, usou-se um

modelo de tumor singênico em camundongos. Camundongos C57BL/6, 8 por grupo, foram implantados por via subcutânea com $1x10^6$ células tumorais MC38 no flanco. Quando os tumores atingiram ~100 mm^3, os animais foram randomizados em grupos e tratados a cada três dias por 3 doses (1x a cada 3 dias x3) com os anticorpos anti-TIGIT clone 13 hIgG1 do tipo selvagem, clone 13 IgG1 afucosilado, 3 mg/kg, anticorpo anti-PD-1 1 mg/kg (anticorpo anti-PD-1 de camundongo, clone 29F.1A12), uma combinação do clone 13 hIgG1 do tipo selvagem/anticorpo anti-PD-1 ou uma combinação do clone 13 IgG1 afucosilado/anticorpo anti-PD-1. O volume tumoral foi monitorado ao longo do temo e os animais foram sacrificados quando a carga tumoral atingiu >1000 mm^3.

[00464] Nesse experimento, tanto o clone 13 hIgG1 do tipo selvagem como o clone 13 IgG1 afucosilado demonstraram boa demora do crescimento tumoral, com 4/8 e 3/8 respostas completas para o anticorpo do tipo selvagem e afucosilado, respectivamente. Ver a Figura FIG. 37, superior à esquerda. O anticorpo anti-PD-1 também mostrou boa eficácia nesse experimento. As terapias combinadas mostraram regressão do tumor ainda mais rápida do que os agentes únicos isoladamente, conforme evidenciado pelos volumes tumorais no Dia 15. Figura 37, superior à direita e inferior.

Exemplo 19: Atividade de anticorpos anti-TIGIT em células de células T humanas *in vitro*

[00465] Para investigar a reativação de células T de memória, realizaram-se experimentos de memória antigênica. PBMCs humanas (100.000 células) de um doador HLA-A2 que mostraram anteriormente ser reativos a peptídeos do CMV, foram ressuspensas em RPMI, contendo FBS 10%, 1X penicilina e 1X glutamina, e espalhadas em poços de fundo redondo de uma placa de 96 poços. As células foram estimuladas com peptídeos do CMV na presença ou ausência e concentrações crescentes dos anticorpos anti-TIGIT clone 13 hIgG1 do tipo selvagem, clone 13 IgG1 afucosilado ou clone

13 hIgG1 LALA-PG por cinco dias. Os sobrenadantes de cultura de tecido foram coletados e a produção de citocinas avaliadas por ensaios Luminex multiplex de acordo com as instruções do fabricante.

[00466] Como mostrado na Figura 21, culturas estimuladas com o anticorpo anti-TIGIT mostraram uma resposta aumentada ao antígeno de CMV como visto por um aumento na produção de IFNγ. O clone 13 IgG1 afucosilado resultou em uma resposta amplificada de células T antígeno-específica até abaixo de 1 pg/mL e essa atividade foi mais robusta do que a resposta associada com o clone 13 IgG1 do tipo selvagem. O anticorpo clone 13 IgG1 LALA-PG efetor nulo foi ineficiente em direcionar uma resposta de células T de memória.

[00467] Para investigar a indução de uma resposta de células T efetoras virgens, uma reação de linfócitos mistos (MLR) unidirecional foi realizada. PBMCs humanas (100.000 células) de um doador HLA-A2 foram ressuspensas em RPMI, contendo FBS 10%, 1X penicilina e 1X glutamina, e cultivadas em proporção 1:1 com PBMCs alogênicas irradiadas de HLA não correspondente em uma placa de fundo redondo com 96 poços. As células foram estimuladas com concentrações crescentes do clone 13 hIgG1 do tipo selvagem, do clone 13 hIgG1 afucosilado ou do clone 13 IgG1 LALA-PG por cinco dias. Os sobrenadantes de cultura de tecido foram coletados e a produção de citocinas avaliada por ensaios Luminex multiplex de acordo com as instruções do fabricante.

[00468] Como mostrado na Figura 22, culturas estimuladas com os anticorpos anti-TIGIT mostraram respostas aumentadas de células T efetoras alogênicas como visto por um aumento na produção de IL-2. O clone 13 IgG1 afucosilado resultou em uma resposta amplificada de células T antígeno-específicas abaixo até 100 pg/mL e essa atividade foi mais robusta do que a resposta associada com o clone 13 IgG1 do tipo selvagem. O anticorpo do clone 13 IgG1 LALA-PG efetor nulo foi ineficiente em direcionar uma

resposta de células T de memória.

[00469] Além de investigar a ativação de células T em ensaios de virgem de antígeno e de memória, o peptídeo estafilocócico enterotoxina B foi usado como um superantígeno em combinação com o clone 13 hIgG1 do tipo selvagem, o clone 13 hIgG1 afucosilado, o clone 13 IgG1 DLE e outro anticorpo anti-TIGIT, H5/L4 IgG1. O clone 13 hIgG1 afucosilado foi capaz de induzir a ativação de células T, conforme medido pela indução de IL-2, de modo mais robusto do que o clone 13 hIgG1 do tipo selvagem ou H5/L4. Figura 38A. O clone 13 IgG1 DLE foi também capaz de induzir a produção de IL-2 quase que modo equivalente ao clone 13 hIgG1 do tipo selvagem e ao clone 13 hIgG1 afucosilado. O clone 13 IgG1 DLE demonstrou induzir simultaneamente a produção de IL-10, em contraste com os outros anticorpos. Figura 38B. Esse resultado foi compatível com relatos de que o envolvimento do receptor FcγRIIb resulta na indução de IL-10. Prevê-se que IgG1 DLE envolva FcγRIIb.

Exemplo 20: Atividade de anticorpos anti-TIGIT em um modelo de tumor murino

[00470] O tratamento de camundongos portadores de tumor (carcinoma CT26 de cólon) com várias formas de um anticorpo anti-TIGIT, quer IgG2a do tipo selvagem, IgG2a LALA-PG efetora nula ou IgG2a afucosilado, resultou em indução sistêmica e tecido-específica de citocinas. Para examinar efeitos potenciais sistêmicos e tecido-específicos do tratamento com anticorpos anti-TIGIT, seis camundongos Balb/c foram implantados com células CT26 de câncer de cólon no flanco e tratados com os anticorpos anti-TIGIT clone 13 IgG2a do tipo selvagem, clone 13 IgG2a afucosilado, clone 13 IgG2a LALA-PG, 1 mg/kg, uma vez a cada três dias por seis doses, ou nenhum tratamento, após os tumores atingirem 100 mm^3. 24 horas depois da 3ª dose e anticorpo anti-TIGIT, a metade dos camundongos foi sacrificada e plasma, baço e tecido tumoral foram coletados. A metade de cada baço e

tumor foi lisada em tampão RIPA com ruptura mecânica. Lisados do plasma e tecido foram então analisados para citocinas usando o kit Millipore 25 pre mix Luminex multiplex, o qual permitiu a análise para 25 citocinas inflamatórias diferentes. Os níveis de citocinas no tecido foram normalizados para outro teor da proteína determinado por BCA (ensaio com ácido bicinconínico.

[00471] Como mostrado na Figura 23, a análise de citocinas não mostrou citocinas aumentadas drasticamente no plasma, o que seria indicativo de uma resposta sistêmica, ou nos tecidos em resposta a quaisquer tratamentos com os anticorpos. Números limitados de citocinas foram observados em camundongos não tratados no plasma e tumor com alterações apenas modestas observadas após o tratamento anti-TIGIT, indicando que o tratamento com TIGIT não iniciou uma resposta inflamatória global mesmo com o anticorpo afucosilado.

[00472] Além da análise de níveis de citocinas induzidas por anti-TIGIT, amostras do tumor e da periferia coletadas 24 horas depois da terceira dose do anticorpo anti-TIGIT foram analisadas quanto a alterações globais na proporção de vários subconjuntos de células T por citometria de fluxo. Suspensões de células tumorais e esplênicas isoladas e de PBMCs dos mesmos camundongos Balb/c, como descrito acima para a Figura 23, foram coradas para vários marcadores da superfície celular para delinear subconjuntos CD8+, CD4+ de células T virgens/de memória (virgem $CD62L^{+}CD44^{-}$, efetora $CD62L^{-}CD44^{-}$, $CD44^{+}CD62L^{+}$ de memória central e $CD44^{+}CD62L^{-}$ efetora de memória) e Treg ($CD25^{+}CD127^{-}$). As amostras foram corridas em um citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e analisadas com FlowJo. Gates foram estabelecidos em células $CD45^{+}$ vivas.

[00473] Como mostrado na Figura 24, aumentos em células T CD8+ no tumor foram observadas em resposta aos anticorpos anti-TIGIT clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e clone 13 mIgG2a afucosilado, mas não o clone 13

mIgG2a LALA-PG efetor nulo, em comparação a animais não tratados (Figura 24, painel superior). Aumentos mais modestos na porcentagem de células T CD8+ após o tratamento com os anticorpos anti-TIGIT foram observados nas PBMCs e no baço. Alterações intratumorais em células T virgens, efetoras e de memória foram também observadas. Especificamente, os níveis de células T CD8+ virgens intratumorais diminuíram após o tratamento com o clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e o clone 13 mIgG2a afucosilado, mas menos com o clone 13 mIgG2a LALA-PG (Figura 24, painel inferior à esquerda). Um aumento na proporção de células $CD8^+CD44^+CD62L^-$ efetoras de memória (Figura 24, painel superior à direita) e células $CD8^+CD44^+CD62L^+$ de memória central (Figura 24, painel superior à esquerda) foi observado no tumor em resposta aos anticorpos clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e afucosilados, mas não em resposta ao anticorpo clone 13 mIgG2a LALA-PG. Essas alterações não foram notadas no baço ou PBMCs, embora algumas alterações leves nesses tecidos tenham ocorrido.

[00474] Subconjuntos de células T CD4+ foram igualmente analisadas por citometria de fluxo quanto a alterações induzidas pelo tratamento com anticorpos anti-TIGIT usando uma estratégia semelhante à descrita acima para células CD8+. Como mostrado na Figura 25 (painel superior à esquerda), o tratamento com o clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e anticorpos afucosilados induziu diminuições leves em células CD4+ em comparação ao tratamento com o anticorpo clone 13 mIgG2a LALA-PG ou animais não tratados. Esse efeito não foi visto nas PBMCs ou no baço. Uma diminuição intratumoral em resposta ao clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e anticorpos afucosilados, mas não ao anticorpo clone 13 LALA-PG, foi também observado em pequena medida na população de Treg CD4+, sugerindo que o tratamento com os anticorpos anti-TIGIT está diminuindo a população imunossupressora de Treg no tumor, mas não nos tecidos normais. De modo semelhante aos resultados com células T CD8+, células T CD4+ virgens

intratumorais diminuíram após o tratamento com o clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e anticorpos afucosilados em comparação a não tratados (Figura 25, painel inferior à esquerda) e esse achado foi simultâneo com um aumento na proporção de células T CD4+ efetoras de memória no tumor (Figura 25, painel no meio à direita). Células T CD4+ e CD8+ efetoras de memória estão envolvidas em suscitar respostas antitumorais e elevação com anticorpos direcionados contra TIGIT pode contribuir para a resposta antitumoral. Muitas dessas alterações na população de células T intratumorais não foram acompanhadas por desvios grandes nessas populações na periferia.

[00475] Após seis doses de anticorpos anti-TIGIT, em aproximadamente 20 dias depois de iniciado o tratamento, os tumores diminuíram e eram quase indetectáveis. Os baços e plasma foram coletados desses camundongos e as células preparadas para citometria de fluxo como descrito acima. Como mostrado na Figura 26A-B, a análise de vários subconjuntos de células T do baço desses camundongos não demonstrou alterações drásticas nos subconjuntos de CD8+ ou CD4+ entre os grupos.

[00476] A indução de citocinas no baço e plasma de camundongos tratados com anticorpos anti-TIGIT foi avaliada por análise multiplex e os resultados são mostrados na Figura 27. Não foi observada produção elevada de citocinas nos baços de animais tratados quando comparados a animais não tratados e, em geral, níveis baixos de citocinas foram detectados no plasma, com a exceção da quimiocina LIX (homólogo de IL8 murino) e eotaxina, as quais foram elevadas em animais não tratados e tratados com certos anticorpos anti-TIGIT.

[00477] A geração de memória antígeno-específica contra o tumor nesses animais foi avaliada usando esplenócitos coletados aproximadamente 20 dias após o início do tratamento com anticorpos anti-TIGIT. Esplenócitos de camundongos tratados com anticorpos anti-TIGIT descritos acima foram ressuspensas em meio de cultura e semeados em poços de uma placa de 96

poços. As células foram deixadas não estimuladas ou voltaram a ser estimuladas com peptídeo AH1 1 μg/mL, que é o alvo dominante para as respostas de células T CD8+ contra o tumor colorretal CT26. Quarenta e oito horas mais tarde, os sobrenadantes de cultura foram coletados e analisados quanto à produção de citocinas via análise multiplex.

[00478] Como mostrado na Figura 28, muito pouca citocina foi produzida na ausência do peptídeo. Uma exceção interessante foi a observação de níveis elevados de IL5 e IL4 produzidas por esplenócitos não estimulados dos animais tratados com o clone 13 mIgG2a afucosilado (Figura 28, painéis inferiores). No entanto, a estimulação de esplenócitos com um peptídeo específico CT-26 resultou na produção robusta de IFNγ e TNFα em animais tratados com o anticorpo clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e afucosilado, mas não em animais tratados com o anticorpo clone 13 mIgG2a LALA-PG (Figura 28, painéis superiores), indicando que os tratamentos com os anticorpos clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e afucosilado são capazes de estimular uma resposta duradoura de células T CD8+ de memória antígeno-específica. A geração de respostas de células T de memória está envolvida no direcionamento de respostas antitumorais de longo prazo. Aumentos na produção de IL4 após reestimulação com peptídeo dos esplenócitos tratados com os anticorpos clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e afucosilado foram também observados (Figura 28, painel inferior à direita). A produção de IL4 e IL5 em esplenócitos não estimulados no grupo do clone 13 mIgG2a afucosilado sem reestimulação pode sugerir indução de uma resposta TH2 por esse anticorpo.

Exemplo 21: Atividade de anticorpos anti-TIGIT em modelos adicionais de tumor murino

[00479] Dois modelos de tumor singênico murino, carcinomas de mama EMT6 e E0771, foram tratados com anticorpo anti-TIGIT clone 13, 5 mg/kg, compreendendo mIgG2a do tipo selvagem, ou anticorpo anti-TIGIT

clone 13 0,1 mg/kg, 1 mg/kg ou 5 mg/kg compreendendo mIgG2a afucosilado. O esquema de administração foi uma dose a cada quatro dias, quatro doses, no total (1x 4/4 dias x4). O comprimento e largura do tumor foram medidos e o volume tumoral calculado usando a fórmula Volume (mm^3) = 0,5 * Comprimento * $Largura^2$ onde comprimento é a dimensão mais longa.

[00480] Como mostrado na Figura 29A-29B, a resposta antitumoral nos modelos de câncer de mama demonstrou demora no crescimento do tumor, mas respostas curativas mínimas. No modelo EMT6, ambos os anticorpos clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e afucosilado a 5 mg/kg demonstraram boa demora no crescimento do tumor com um aumento na sobrevida média de 30,5 dias para 37 e 39 dias, respectivamente (Figura 29A). Grupos de doses adicionais do anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado demonstraram alguma perda de atividade nas doses menores, com sobrevida global de somente 35,2 e 36,8 dias observada com as doses de 1 e 0,1 mg/kg, mas o crescimento tumoral foi ainda retardado em comparação a controles não tratados (Figura 29A).

[00481] No modelo E0771, uma demora mais modesta no crescimento do tumor foi observada para ambos os anticorpos clone 13 mIgG2a do tipo selvagem e afucosilado a 5 mg/kg, com um aumento na sobrevida média de 38,6 dias para 44 e 42 dias, respectivamente (Figura 29B). Além disso, um em seis camundongos pareceram ser curados com o anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado nas doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg. Os grupos de doses menores do anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado, 1 mg/kg e 0,1 mg/kg, resultou em sobrevida global média de 39 dias (Figura 29B).

[00482] Além disso, o anticorpo clone 13 mIgG2a do tipo selvagem, 1 mg/kg, foi avaliado em um segundo modelo CT26 de câncer de cólon, que foi obtido de um laboratório externo (MI Bioresearch). Como mostrado na Figura 29C, nesse modelo CT26 de câncer de cólon, o anticorpo clone 13 mIgG2a do

tipo selvagem demonstrou um aumento na sobrevida global média de 30 dias para 40 dias com o tratamento, mas somente induziu uma regressão completa (16%). Como mostrado na Figura 18B, o modelo CT26 de câncer de cólon que foi mantido na Seattle Genetics mostrou 50% (3/6) de regressões completas com o anticorpo clone 13 IgG2a do tipo selvagem, 1 mg/kg.

Exemplo 22: Análise RNA-Seq e correlação de resposta *in vivo* com assinaturas moleculares

[00483] Para avaliar as diferenças nas respostas de dois modelos CT26 de câncer de cólon, bem como outros modelos de câncer singênico, usou análise RNA-seq para identificar alterações subjacentes nos transcriptomas entre os modelos. Leituras brutas de RNA-seq (formato fastq) para tumores representativos não tratados de cada modelo estavam disponíveis como segue.

A20 (mantido na Seattle Genetics), 2 réplicas

CT26 (mantido na Seattle Genetics), 2 réplicas

CT26 (obtido da MIBio), 1 réplica

E0771 (obtido da MIBio), 1 réplica

EMT-6 (obtido da MIBio), 1 réplica

MC38 (mantido na Seattle Genetics), 1 réplica

[00484] Leituras de RNA-seq das amostras foram processadas em um canal (*pipeline*) padrão que consistia em aparagem do adaptador (cutadapt), alinhamento com o genoma/transcriptoma de camundongo (STAR) e quantificação de transcritos (RSEM). Os valores da expressão de genes normalizados para FPKM (fragmentos por quilobase por milhão de leituras) foram usados para análises subsequentes. Com base na inspeção de curvas de resposta *in vivo*, os modelos foram classificados como segue em termos da sua resposta global ao tratamento TIGIT WT: respondedores completos = A20 (Seattle Genetics; Figura 18A), CT26 (Seattle Genetics; Figura 18B) e respondedores parciais = CT26 (MIBio; Figura 29C), EMT-6 (MIBio; Figura 29A), E0771 (MIBio; Figura 29B), MC38 (Seattle Genetics; Figura 18C). As

diferenças entre os dois modelos CT26 de câncer de cólon em nível transcricional foram observadas, sugerindo que pode ser importante caracterizar os modelos usados para estudos de eficácia.

[00485] Assinaturas moleculares relacionadas ao microambiente do tumor (TME) que podem se correlacionar com a resposta foram também determinadas pela compilação de assinaturas de genes pertencentes ao sistema imune e a resposta imune de duas fontes publicadas: Mosely *et al*., "*Rational selection of syngeneic preclinical tumor models for immunoutroapeutic drug discovery*", *Cancer Immunol Res* 2017;5:29-41; e TCIA, *The Cancer Immunome Atlas* (tcia.at/home), com assinaturas retiradas de Charoentong *et al*., "*Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade*", *Cell Rep* 2017 Jan 3;18(1):248-262. As assinaturas de genes dessas fontes consistem em listas de genes cuja expressão é alta em um contexto biológico em particular - em células T CD8+, por exemplo. As assinaturas de genes TCIA são derivadas de humanos, de modo que os genes em cada uma dessas assinaturas foram mapeados contra os ortólogos de camundongo, usando a biblioteca R biomaRt. Aproximadamente 50 assinaturas de genes foram consideradas, no total, e cada uma das oito amostras RNA-seq de tumor não tratado foram pontuadas contra cada uma das 50 assinaturas pela soma dos valores de amostras FPKM dos genes na assinatura.

[00486] Para avaliar quantitativamente quais pontuações de assinaturas de genes separavam os respondedores fortes dos respondedores fracos, o vetor de pontuações de assinatura entre todas as amostras foi correlacionado com um vetor de resposta (Correlação de Pearson, 0 para respondedores fracos, 1 para respondedores fortes). As assinaturas com correlação particularmente alta com resposta incluíam células NK e células T CD8 ativada (Figura 30). Nos dois casos, os respondedores mais fortes obtiveram pontuação mais alta

nos subconjuntos imunes quando comparados aos respondedores mais fracos. A Tabela 4 mostra um resumo da correlação entre certos subconjuntos de células imunes e respostas de células tumorais ao tratamento com anticorpos anti-TIGIT.

Tabela 4:

Assinatura gênica	Correlação	Valor p
Célula T gama delta	0,9262	0,0009
Célula NK	0,9200	0,0012
Célula T CD8 ativada	0,8535	0,0070
DC ativada	-0,8437	0,0085
Célula B imatura	0,7875	0,0203
CD96	0,7569	0,0297
Célula T CD8	0,7569	0,0297
Célula *natural killer* $CD56^{bright}$	0,7319	0,0390
Célula T helper 17	0,7139	0,0467
Célula T CD4 ativada	0,7092	0,0488

[00487] Sem a intenção de estar preso a qualquer teoria em particular, como o bloqueio de TIGIT pode estimular a morte tumoral mediada por células NK e células T CD8, um *pool* maior disponível dessas populações de células imunes no TME pode explicar a resposta mais forte nos modelos com pontuação maior para esses subconjuntos.

[00488] Curiosamente, a expressão de TIGIT não foi um diferenciador forte da resposta nessa avaliação, nem foi a expressão de CD155 (Figura 31). Por exemplo, o modelo CT26 de câncer de cólon da Seattle Genetics revelou a maior expressão de CD155 de todos os modelos, enquanto o modelo A20 de linfoma obteve a menor, embora ambos sejam respondedores fortes.

Exemplo 23: Anticorpo anti-TIGIT reforça resposta de Th1

[00489] Para avaliar se o anticorpo clone 13 anti-TIGIT ajuda no direcionamento da resposta de células T antígeno-específica, camundongos Balb/c (5 por grupo) foram vacinados uma vez com 100 µg do antígeno modelo ovalbumina (OVA) na presença do adjuvante completo de Freund (CFA) por via subcutânea. Ao mesmo tempo, administrou-se aos camundongos o anticorpo clone 13 IgG2a do tipo selvagem, clone 13 mIgG2a afucosilado ou clone 13 mIgG2a LALA-PG, 1 mg/kg, e então três doses mais

em intervalos de três dias (1x 3/3 dias x4). Quatorze dias após a vacinação, os camundongos foram analisados quanto à indução de imunidade antígeno-específica usando um ensaio ELISA de IgG1 e IgG2a anti-OVA. Os esplenócitos foram reestimulados e avaliados quanto à indução de citocinas.

[00490] Os ensaios ELISA anti-OVA demonstraram que a coadministração de qualquer anticorpo, o clone 13 IgG2a do tipo selvagem ou o clone 13 mIgG2a LALA-PG, enquanto os camundongos eram submetidos ao *priming* (preparação) antígeno-específico induzido pela vacina, reforçaram os níveis dos anticorpos IgG1 gerados em ~1,5 vez. O anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado não reforçou os níveis de anticorpos IgG1 antígeno-específicos nesse experimento (Figura 32, painel à direita). Esses dados sugerem que o bloqueio de TIGIT é capaz de aumentar o *priming* de uma resposta de CD4/Th2, mas a função efetora aumentada anula esse efeito. O bloqueio de TIGIT também reforçou os níveis de anticorpos IgG2a antígeno-específicos (Figura 32, painel à direita), mas nesse caso, o anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado mostrou o maior efeito. Em suma, uma correlação inversa foi observada entre níveis de IgG1 e função efetora reforça, enquanto os níveis de IgG2a foram correlacionados diretamente com função efetora aumentada, com o anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado aumentando os níveis de IgG2a anti-OVA em mais de 9 vezes. Os anticorpos clone 13 IgG2a do tipo selvagem e clone 13 mIgG2a LALA-PG também reforçaram os níveis de IgG2a, mas somente em ~4 vezes (Figura 32, painel à direita). Embora o bloqueio de TIGIT isoladamente não fosse suficiente para desviar esse sistema fortemente em favor de Th2, o qual é impulsionado pela linhagem de camundongo e adjuvante utilizados, em direção a Th1 nesse experimento, foi demonstrado que o bloqueio de TIGIT aumenta uma resposta de Th1 e a resposta foi correlacionada com função efetora.

[00491] Além de analisar a produção de anticorpos antígeno-específicos, a indução de células T antígeno-específicas foi também avaliada.

Números equivalentes de esplenócitos de cada camundongo foram reestimulados *ex vivo* com 1 µg de proteína inteira (OVA) por 72 horas, seguido por análise de citocinas por células T efetoras. A produção da citocinas IL-2 por células T ativadas em resposta à reestimulação com o antígeno ("OVA 1 µg/mL") foi aumentada no grupo tratado com antígeno/adjuvante em relação a animais não tratados, como esperado, e essa foi aumentada mais em esplenócitos de animais tratados com anticorpo anti-TIGIT de função efetora possibilitada (clone 13 IgG2a do tipo selvagem) ou aumentada (clone 13 mIgG2a afucosilado) durante o *priming* (Figura 33, painel inferior à direita). Esses resultados são compatíveis com a capacidade de bloqueio de TIGIT para aumentar a geração de uma resposta de células T virgens antígeno-específicas. A análise das citocinas IL-5 e IL-4 de Th2 efetora demonstrou alguma indução adicional após a reestimulação com antígeno em relação ao antígeno/adjuvante isoladamente de animais tratados com anticorpos anti-TIGIT, embora uma correlação menos clara entre função efetora e resposta fosse observada (Figura 33, painéis à esquerda). Para a citocina IFNγ de células Th1/T CD8, o bloqueio de TIGIT durante o evento de *priming* com o antígeno aumentou mais profundamente a geração de células T antígeno-específicas (Figura 33, painel superior à direita). O reforço mais significativo foi observado em esplenócitos de animais tratados com o anticorpo clone 13 mIgG2a afucosilado efetor aumentado.

Exemplo 24: Anticorpo anti-TIGIT induz células T CD8 de memória antitumorais de longa duração

[00492] Camundongos que mostraram uma resposta completa no modelo de tumor singênico CT26 de câncer de cólon após o tratamento com clone 13 mIgG2a afucosilado ou anticorpo não modificado e quatro camundongos não tratados foram reexpostos (*re-challenged*) a células CT26 de câncer de cólon. Como mostrado na Figura 34, os camundongos que haviam mostrado uma resposta complete após o tratamento 1 mg/kg ou 5

mg/kg tratamento com clone 13 mIgG2a afucosilado ou anticorpo não modificado pareceram ter células T CD8 de memória antitumorais de longa duração que foram capazes de rejeitar células tumorais reexpostas.

[00493] Embora a invenção acima tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para efeitos de clareza de entendimento, o técnico no assunto reconhecerá que muitas modificações e variações desta invenção podem ser efetuadas sem que se desviem de seu espírito e alcance. As modalidades específicas aqui descritas são oferecidas a título de exemplo somente e não destinam a ser limitantes de maneira alguma. A intenção é que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados exemplares somente, sendo o verdadeiro alcance e espírito da invenção indicado pelas reivindicações a seguir.

Exemplo 25: Ligação de anticorpos anti-TIGIT aos receptores Fcγ

[00494] *In vivo*, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer* podem mediar ADCP, ADCC e CDC via FcγRI, FcγRII e FcγRIIIa. Para avaliar a ligação ao FcγR celular, células CHO foram transfectada com FcγRI, FcγIIa, FcγIIB humanos ou com receptor FcγRIIIa V/V de alta afinidade. As células foram expostas a concentrações crescentes das versões do anticorpo IgG1 anti-TIGIT do tipo selvagem, afucosilado, LALA-PG ou DLE do clone 13 ou outro anticorpo anti-TIGIT, H5L4. A ligação foi monitorada utilizando um anticorpo secundário anti-Fc humano com etiqueta fluorescente e citometria de fluxo.

[00495] Como mostrado na Figura 39A, todos os anticorpos, exceto a cadeia principal inativa de IgG1 LALA-PG, ligaram-se substancialmente de modo equivalente a FcγRI na superfície de células CHO. As cadeias principais de IgG1 afucosilado e IgG1 DLE exibiram ligação aumentada a FcγRIIIa na superfície de células CHO. Figura 39B. A ligação a FcyRIIa e a FcγRIIb na superfície de células CHO foi maior com a cadeia principal de

IgG1 do tipo selvagem e cadeia principal reforçada de IgG1 DLE efetora. Figura 39C e Figura 39D. A cadeia principal de IgG1 afucosilada apresentou menor afinidade de ligação a FcγRIIa e a FcγRIIb quando comparada à cadeia principal de IgG1 do tipo selvagem, embora sua afinidade de ligação fosse maior do que a cadeia principal de IgG1 LALA-PG. Figura 39C e Figura 39D. Ligação reduzida ao receptor FcγRIIb inibidor pode influenciar a resposta imune mediada pela cadeia principal de IgG1 afucosilada.

Exemplo 26: Fagocitose mediada por anticorpo anti-TIGIT

[00496] O termo “fagocitose celular dependente de anticorpo” ou “ADCP” refere-se ao processo pelo qual células ligadas a anticorpos são internalizadas no todo ou em parte, por células imunes fagocitárias (p. ex., por macrófagos, neutrófilos e/ou células dendríticas) que se ligam a uma região Fc de um anticorpo.

[00497] Versões do tipo selvagem, afucosilada e DLE do anticorpo IgG1 anti-TIGIT do clone 13 foram analisadas quanto à fagocitose mediada pelo anticorpo usando monócitos/macrófagos humanos e células T Jurkat TIGIT-positivas. Células T Jurkat TIGIT humano-positivas, marcadas com corante vermelho fluorescente PKH, foram opsonizadas por 30 minutos com concentrações crescentes de anticorpos anti-TIGIT. As células foram lavadas e incubadas em proporção 10:1 com monócitos-macrófagos por 18 horas. As amostras foram lavadas 3 vezes e submetidas à citometria de fluxo para avaliar fagocitose.

[00498] Como mostrado na Figura 40, os anticorpos IgG1 anti-TIGIT do clone 13 do tipo selvagem e afucosilado mediaram níveis semelhantes de fagocitose, enquanto o anticorpo IgG1 DLE do clone 13 foi menos eficaz em mediar a atividade fagocitária.

[00499] Além de ADCC e ADCP, as regiões Fc de anticorpos ligados a células podem também ativar a via clássica do complemento e provocar CDC. C1q do sistema complemento liga-se às regiões Fc de anticorpos quando são

complexados com antígeno. A ligação de C1q a anticorpos ligados a células pode iniciar uma cascata de eventos envolvendo a atividade proteolítica de C4 e C2 para gerar a C3 convertase. A clivagem de C3 em C3b pela C3 convertase torna possível a ativação de componentes terminais do complemento, incluindo C5b, C6, C7, C8 e C9. Coletivamente, essas proteínas formam poros do complexo de ataque à membrana nas células revestidas com anticorpo. Esses poros rompem a integridade da membrana celular, eliminando a célula alvo via citotoxicidade dependente do complemento ou "CDC".

[00500] As versões do tipo selvagem, afucosilada, LALA-PG e DLE do anticorpo IgG1 anti-TIGIT do clone 13, bem como H5/L4 foram analisadas quanto à atividade CDC usando células T Jurkat TIGIT+ como células alvo. As células Jurkat foram incubadas com doses crescentes dos anticorpos na presença de soro humano (não inativado com calor) por 2 horas a 37 ºC em meio contendo SYTOX® verde, que é excluído de células vivas, mas absorvido quando da ativação de CDC e lise. Depois da incubação, as amostras foram analisadas em um leitor de placas, o sinal de fundo foi subtraído e a % de lise máxima foi calculada determinando o sinal máximo emitido por células mortas com uma solução de Triton X 1%.

[00501] Como mostrado na Figura 41, nenhum dos anticorpos anti-TIGIT testados mediaram atividade CDC. Em contraste, o anticorpo and-CD47 [sic] hB6H12.3 mediou atividade CDC robusta nesse sistema. A indução de CDC por anticorpos é conformacionalmente dependente e frequentemente depende do epítopo que eles ligam. Esses resultados sugerem que o epítopo de TIGIT ligado pelos anticorpos não permite a ligação adequada a C1q.

[00502] Todas as publicações, patentes, pedidos de patente ou outros documentos citados são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência para todos os efeitos na mesma medida em que o seria caso cada publicação,

patente, pedido de patente ou outro documento fosse individualmente indicado para ser incorporado por referência para todos os efeitos.

Tabela de sequências

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Proteína VH do Clone 2	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPG KGLEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARGQYYYGSSSRGYYYMDVWGQGTTV TVSS
DNA de VH do Clone 2	2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTCAGTGACCACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTACTAGAAACAAAG CTAACAGTTACACCACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCGGTG TACTACTGCGCCAGAGGCCAGTACTACTACGGCAGCAGCAG CAGAGGTTACTACTACATGGACGTATGGGGCCAGGGAACA ACCGTCACCGTCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 2	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
CDR1 de VH do Clone 2	4	FTFSDHYMD
FR2 de VH do Clone 2	5	WVRQAPGKGLEWVG
CDR2 de VH do Clone 2	6	RTRNKANSYTTEYAASVKG
FR3 de VH do Clone 2	7	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 2	8	ARGQYYYGSSSRGYYYMDV
FR4 de VH do Clone 2	9	WGQGTTVTVSS
Proteína VL dos Clones 2 e 2C	10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQAVPSPLTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 2	11	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGTCCCCAGTCCT CTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 2	12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
CDR1 de VL dos Clones 2 e 2C	13	RASQSVSSSYLA
FR2 de VL do Clone 2	14	WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2 de VL dos Clones 2 e 2C	15	GASSRAT
FR3 de VL do Clone 3	16	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
CDR3 de VL dos Clones 2 e 2C	17	QQAVPSPLT
FR4 de VL do Clone 2	18	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 3	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPG KGLEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARGQYYYGSSSRGYYYMDVWGQGTTV TVSS

Nome	SEQ ID NO	Sequência
DNA de VH do Clone 3	20	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTCAGTGACCACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTACTAGAAACAAAG CTAACAGTTACACCACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCGGTG TACTACTGCGCCAGAGGCCAGTACTACTACGGCAGCAGCAG CAGAGGTTACTACTACATGGACGTATGGGGCCAGGGAACA ACCGTCACCGTCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 3	21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
CDR1 de VH do Clone 3	22	FTFSDHYMD
FR2 de VH do Clone 3	23	WVRQAPGKGLEWVG
CDR2 de VH do Clone 3	24	RTRNKANSYTTEYAASVKG
FR3 de VH do Clone 3	25	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 3	26	ARGQYYYGSSSRGYYYMDV
FR4 de VH do Clone 3	27	WGQGTTVTVSS
Proteína VL do Clone 3	28	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQVGPPLTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 3	29	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGTCGGACCCCCCCTC ACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 3	30	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
CDR1 de VL do Clone 3	31	RASQSVRSSYLA
FR2 de VL do Clone 3	32	WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2 de VL do Clone 3	33	GASSRAT
FR3 de VL do Clone 3	34	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
CDR3 de VL do Clone 3	35	QQVGPPLT
FR4 de VL do Clone 3	36	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 5	37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKGPRYQDRAGMDVWGQGTTVTVSS
DNA de VH do Clone 5	38	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTTAGCACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGG TGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACT GCGCCAAGGGCCCCAGATACCAAGACAGGGCAGGAATGGA CGTATGGGGCCAGGGAACAACTGTCACCGTCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 5	39	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
CDR1 de VH do Clone 5	40	FTFSTYAMS
FR2 de VH do Clone 5	41	WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 de VH do Clone 5	42	AISGSGGSTYYADSVKG
FR3 de VH do Clone 5	43	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 5	44	AKGPRYQDRAGMDV
FR4 de VH do Clone 5	45	WGQGTTVTVSS
Proteína VL do Clone 5	46	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSLATPYTFGGGTKVEIK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
DNA de VL do Clone 5	47	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGA GCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGAT TTTGCAACTTACTACTGTCAGCAAAGCCTCGCCACTCCTTAC ACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 5	48	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
CDR1 de VL do Clone 5	49	RASQSISSYLN
FR2 de VL do Clone 5	50	WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 de VL do Clone 5	51	AASSLQS
FR3 de VL do Clone 5	52	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 de VL do Clone 5	53	QQSLATPYT
FR4 de VL do Clone 5	54	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 13	55	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLVTVSS
DNA de VH do Clone 13	56	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGGCCCTTCTGAAGTAGGAGCAATACTCGGATA TGTATGGTTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG TCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 13	57	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
CDR1 de VH do Clone 13	58	GTFSSYAIS
FR2 de VH do Clone 13	59	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH do Clone 13	60	SIIPIFGTANYAQKFQG
FR3 de VH do Clone 13	61	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
CDR3 de VH dos Clones 13 e 13A	62	ARGPSEVGAILGYVWFDP
FR4 de VH do Clone 13	63	WGQGTLVTVSS
Proteína VL dos Clones 13, 13A, 13B, 13C e 13D	64	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQK PGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQARRIPITFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 13	65	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAG CCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCT GCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGG GTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGC AGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGGCAA GACGAATCCCTATCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAG ATCAAA
FR1 de VL do Clone 13	66	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
CDR1 de VL dos Clones 13, 13A, 13B, 13C e 13D	67	RSSQSLLHSNGYNYLD
FR2 de VL do Clone 13	68	WYLQKPGQSPQLLIY
CDR2 de VL dos Clones 13, 13A, 13B, 13C e 13D	69	LGSNRAS
FR3 de VL do Clone 13	70	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
CDR3 de VL dos Clones 13, 13A, 13B, 13C e 13D	71	MQARRIPIT
FR4 de VL do Clone 13	72	FGGGTKVEIK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Proteína VH do Clone 14	73	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLVTVSS
DNA de VH do Clone 14	74	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGGCCCTTCTGAAGTAGGAGCAATACTCGGATA TGTATGGTTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG TCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 14	75	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
CDR1 de VH do Clone 14	76	GTFSSYAIS
FR2 de VH do Clone 14	77	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH do Clone 14	78	SIIPIFGTANYAQKFQG
FR3 de VH do Clone 14	79	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 14	80	ARGPSEVGAILGYVWFDP
FR4 de VH do Clone 14	81	WGQGTLVTVSS
Proteína VL do Clone 14	82	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQK PGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQAKRLPLTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 14	83	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAG CCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCT GCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGG GTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGC AGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGGCAA AACGACTCCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAG ATCAAA
FR1 de VL do Clone 14	84	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
CDR1 de VL do Clone 14	85	RSSQSLLHSNGYNYLD
FR2 de VL do Clone 14	86	WYLQKPGQSPQLLIY
CDR2 de VL do Clone 14	87	LGSNRAS
FR3 de VL do Clone 14	88	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
CDR3 de VL do Clone 14	89	MQAKRLPLT
FR4 de VL do Clone 14	90	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 16	91	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARQSTWHKLYGTDVWGQGTTVTVSS
DNA de VH do Clone 16	92	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCT TTGGTACAGCAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCAAGACAGAGCACCTGGCACAAATTGTACGGAACGG ACGTATGGGGCCAGGGAACAACTGTCACCGTCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 16	93	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
CDR1 de VH do Clone 16	94	GTFSSYAIS
FR2 de VH do Clone 16	95	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH do Clone 16	96	GIIPIFGTASYAQKFQG
FR3 de VH do Clone 16	97	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 16	98	ARQSTWHKLYGTDV
FR4 de VH do Clone 16	99	WGQGTTVTVSS

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Proteína VL dos Clones 16, 16C, 16D e 16E	100	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGDSLPPTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 16	101	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGG GTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT TTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGGGAGACAGTCTCCCTCCT ACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 16	102	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
CDR1 de VL dos Clones 16, 16C, 16D e 16E	103	RASQGISSWLA
FR2 de VL do Clone 16	104	WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 de VL dos Clones 16, 16C, 16D e 16E	105	AASSLQS
FR3 de VL do Clone 16	106	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 de VL dos Clones 16, 16C, 16D e 16E	107	QQGDSLPPT
FR4 de VL do Clone 16	108	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 18	109	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMSWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARVRYGYADGMDVWGQGTTVTVSS
DNA de VH do Clone 18	110	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATAC ACCTTCACCAGCTACTATATGTCATGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTG GTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGT CACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGTGAGGTACGGATACGCAGACGGAATGGACG TATGGGGCCAGGGAACAACTGTCACCGTCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 18	111	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
CDR1 de VH do Clone 18	112	YTFTSYYMS
FR2 de VH do Clone 18	113	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH do Clone 18	114	IINPSGGSTSYAQKFQG
FR3 de VH do Clone 18	115	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 18	116	ARVRYGYADGMDV
FR4 de VH do Clone 18	117	WGQGTTVTVSS
Proteína VL do Clone 18	118	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QVYHLPFTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 18	119	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGA GCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGAT TTTGCAACTTACTACTGTCAGCAAGTATACCACCTCCCTTTC ACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 18	120	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
CDR1 de VL do Clone 18	121	RASQSISSYLN
FR2 de VL do Clone 18	122	WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 de VL do Clone 18	123	GASSLQS
FR3 de VL do Clone 18	124	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 de VL do Clone 18	125	QQVYHLPFT
FR4 de VL do Clone 18	126	FGGGTKVEIK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Proteína VH do Clone 21	127	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPG KGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDPLYQDAPFDYWGQGTLVTVSS
DNA de VH do Clone 21	128	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGC CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCT CCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAG CCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTA TAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAG TCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG AAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTA CTGCGCCAGAGATCCTTTGTACCAAGACGCTCCCTTCGACT ATTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 21	129	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
CDR1 de VH do Clone 21	130	GSISSSSYYWG
FR2 de VH do Clone 21	131	WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 de VH do Clone 21	132	SIYYSGSTYYNPSLKS
FR3 de VH do Clone 21	133	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 21	134	ARDPLYQDAPFDY
FR4 de VH do Clone 21	135	WGQGTLVTVSS
Proteína VL do Clone 21	136	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRANFPTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 21	137	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGC CACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGAGAGCCAACTTCCCTACT TTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 21	138	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
CDR1 de VL do Clone 21	139	RASQSVSSYLA
FR2 de VL do Clone 21	140	WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2 de VL do Clone 21	141	DASNRAT
FR3 de VL do Clone 21	142	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
CDR3 de VL do Clone 21	143	QQRANFPT
FR4 de VL do Clone 21	144	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 22	145	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWAWIRQPPG KGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARQGYYYGSSGSVDFDLWGRGTLVTVSS
DNA de VH do Clone 22	146	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGC CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACT CCATCAGCAGTGGTTACTACTGGGCTTGGATCCGGCAGCCC CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATCATA GTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC ACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAA GCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACT GCGCCAGGCAGGGATACTACTACGGCAGCAGCGGCAGTGT AGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCT CCTCA
FR1 de VH do Clone 22	147	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSG
CDR1 de VH do Clone 22	148	YSISSGYYWA
FR2 de VH do Clone 22	149	WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 de VH do Clone 22	150	SIYHSGSTYYNPSLKS
FR3 de VH do Clone 22	151	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 22	152	ARQGYYYGSSGSVDFDL
FR4 de VH do Clone 22	153	WGRGTLVTVSS

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Proteína VL do Clone 22	154	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQANSLPPWTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 22	155	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGG GTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAATTTGCA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT TTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGCAAATAGTCTCCCTCCT TGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 22	156	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
CDR1 de VL do Clone 22	157	RASQGISSWLA
FR2 de VL do Clone 22	158	WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 de VL do Clone 22	159	AASNLQS
FR3 de VL do Clone 22	160	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 de VL do Clone 22	161	QQANSLPPWT
FR4 de VL do Clone 22	162	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 25	163	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDLSSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVSS
DNA de VH do Clone 25	164	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACA CCTTTACCAGCTATGCCATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA ATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGT CACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCAAGGGATTTGTCTAGCTTCTGGAGCGGAGACGTGTT AGGAGCCTTCGACATATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCG TCTCCTCA
FR1 de VH do Clone 25	165	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
CDR1 de VH dos Clones 25 e 25A	166	YTFTSYAIS
FR2 de VH do Clone 25	167	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH dos Clones 25 e 25E	168	WISAYNGNTNYAQKLQG
FR3 de VH do Clone 25	169	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC
CDR3 de VH dos Clones 25, 25A e 25B	170	ARDLSSFWSGDVLGAFDI
FR4 de VH do Clone 25	171	WGQGTMVTVSS
Proteína VL dos Clones 25, 25A, 25B, 25C, 25D e 25E	172	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSVPPRTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 25	173	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGA GCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGAT TTTGCAACTTACTACTGTCAGCAAAGCGTCCCCCCCAGGAC TTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 25	174	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
CDR1 de VL dos Clones 25, 25A, 25B, 25C, 25D e 25E	175	RASQSISSYLN
FR2 de VL do Clone 25	176	WYQQKPGKAPKLLIY

Nome	SEQ ID NO	Sequência
CDR2 de VL dos Clones 25, 25A, 25B, 25C, 25D e 25E	177	AASSLQS
FR3 de VL do Clone 25	178	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 de VL dos Clones 25, 25A, 25B, 25C, 25D e 25E	179	QQSVPPRT
FR4 de VL do Clone 25	180	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 27	181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDLSSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVSS
DNA de VH do Clone 27	182	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACA CCTTTACCAGCTATGCCATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA ATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGT CACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCAAGGGATTTGTCTAGCTTCTGGAGCGGAGACGTGTT AGGAGCCTTCGACATATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCG TCTCCTCA
FR1 de VH do Clonec27	183	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
CDR1 de VH do Clone 27	184	YTFTSYAIS
FR2 de VH do Clone 27	185	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH do Clone 27	186	WISAYNGNTNYAQKLQG
FR3 de VH do Clone 27	187	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 27	188	ARDLSSFWSGDVLGAFDI
FR4 de VH do Clone 27	189	WGQGTMVTVSS
Proteína VL do Clone 27	190	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQHANHITFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 27	191	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCACGCCAATCACATCACT TTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 27	192	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
CDR1 de VL do Clone 27	193	RASQSVSSNLA
FR2 de VL do Clone 27	194	WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2 de VL do Clone 27	195	GASTRAT
FR3 de VL do Clone 27	196	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
CDR3 de VL do Clone 27	197	QQHANHIT
FR4 de VL do Clone 27	198	FGGGTKVEIK
Proteína VH do Clone 54	199	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARASDSYGVGLYYGMDVWGQGTTVTVSS

Nome	SEQ ID NO	Sequência
DNA de VH do Clone 54	200	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATAC ACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCC TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTG GTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGT CACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCTAGGGCATCTGACTCCTACGGAGTGGGCCTCTACTA CGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACTGTCACCGTCT CCTCA
FR1 de VH do Clone 54	201	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
CDR1 de VH do Clone 54	202	YTFTSYYMH
FR2 de VH do Clone 54	203	WVRQAPGQGLEWMG
CDR2 de VH do Clone 54	204	IINPSGGSTSYAQKFQG
FR3 de VH do Clone 54	205	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC
CDR3 de VH do Clone 54	206	ARASDSYGVGLYYGMDV
FR4 de VH do Clone 54	207	WGQGTTVTVSS
Proteína VL do Clone 54	208	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYYVSPLTFGGGTKVEIK
DNA de VL do Clone 54	209	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACTACGTCAGTCCT CTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
FR1 de VL do Clone 54	210	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
CDR1 de VL do Clone 54	211	RASQSVRSSYLA
FR2 de VL do Clone 54	212	WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2 de VL do Clone 54	213	GASSRAT
FR3 de VL do Clone 54	214	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
CDR3 de VL do Clone 54	215	QQYYVSPLT
FR4 de VL do Clone 54	216	FGGGTKVEIK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência do cDNA de TIGIT humano (Nº de Acesso GenBank NM_173799.3)	217	CGTCCTATCTGCAGTCGGCTACTTTCAGTGGCAGAAGAGGC CACATCTGCTTCCTGTAGGCCCTCTGGGCAGAAGCATGCGC TGGTGTCTCCTCCTGATCTGGGCCCAGGGGCTGAGGCAGGC TCCCCTCGCCTCAGGAATGATGACAGGCACAATAGAAACAA CGGGGAACATTTCTGCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTA CAATGTCACCTCTCCTCCACCACGGCACAAGTGACCCAGGT CAACTGGGAGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTGTAATG CTGACTTGGGGTGGCACATCTCCCCATCCTTCAAGGATCGA GTGGCCCCAGGTCCCGGCCTGGGCCTCACCCTCCAGTCGCT GACCGTGAACGATACAGGGGAGTACTTCTGCATCTATCACA CCTACCCTGATGGGACGTACACTGGGAGAATCTTCCTGGAG GTCCTAGAAAGCTCAGTGGCTGAGCACGGTGCCAGGTTCCA GATTCCATTGCTTGGAGCCATGGCCGCGACGCTGGTGGTCA TCTGCACAGCAGTCATCGTGGTGGTCGCGTTGACTAGAAAG AAGAAAGCCCTCAGAATCCATTCTGTGGAAGGTGACCTCAG GAGAAAATCAGCTGGACAGGAGGAATGGAGCCCCAGTGCT CCCTCACCCCCAGGAAGCTGTGTCCAGGCAGAAGCTGCACC TGCTGGGCTCTGTGGAGAGCAGCGGGGAGAGGACTGTGCC GAGCTGCATGACTACTTCAATGTCCTGAGTTACAGAAGCCT GGGTAACTGCAGCTTCTTCACAGAGACTGGTTAGCAACCAG AGGCATCTTCTGGAAGATACACTTTTGTCTTTGCTATTATAG ATGAATATATAAGCAGCTGTACTCTCCATCAGTGCTGCGTG TGTGTGTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTTCAGTTGAGTGAA TAAATGTCATCCTCTTCTCCATCTTCATTTCCTTGGCCTTTTC GTTCTATTCCATTTTGCATTATGGCAGGCCTAGGGTGAGTAA CGTGGATCTTGATCATAAATGCAAAATTAAAAAATATCTTG ACCTGGTTTTAAATCTGGCAGTTTGAGCAGATCCTATGTCTC TGAGAGACACATTCCTCATAATGGCCAGCATTTTGGGCTAC AAGGTTTTGTGGTTGATGATGAGGATGGCATGACTGCAGAG CCATCCTCATCTCATTTTTTCACGTCATTTTCAGTAACTTTCA CTCATTCAAAGGCAGGTTATAAGTAAGTCCTGGTAGCAGCC TCTATGGGGAGATTTGAGAGTGACTAAATCTTGGTATCTGC CCTCAAGAACTTACAGTTAAATGGGGAGACAATGTTGTCAT GAAAAGGTATTATAGTAAGGAGAGAAGGAGACATACACAG GCCTTCAGGAAGAGACGACAGTTTGGGGTGAGGTAGTTGGC ATAGGCTTATCTGTGATGAAGTGGCCTGGGAGCACCAAGGG GATGTTGAGGCTAGTCTGGGAGGAGCAGGAGTTTTGTCTAG GGAACTTGTAGGAAATTCTTGGAGCTGAAAGTCCCACAAAG AAGGCCCTGGCACCAAGGGAGTCAGCAAACTTCAGATTTTA TTCTCTGGGCAGGCATTTCAAGTTTCCTTTTGCTGTGACATA CTCATCCATTAGACAGCCTGATACAGGCCTGTAGCCTCTTCC GGCCGTGTGTGCTGGGGAAGCCCCAGGAAACGCACATGCC CACACAGGGAGCCAAGTCGTAGCATTTGGGCCTTGATCTAC CTTTTCTGCATCAATACACTCTTGAGCCTTTGAAAAAAGAA CGTTTCCCACTAAAAAGAAAATGTGGATTTTTAAAATAGGG ACTCTTCCTAGGGGAAAAAGGGGGGCTGGGAGTGATAGAG GGTTTAAAAAATAAACACCTTCAAACTAACTTCTTCGAACC CTTTTATTCACTCCCTGACGACTTTGTGCTGGGGTTGGGGTA ACTGAACCGCTTATTTCTGTTTAATTGCATTCAGGCTGGATC TTAGAAGACTTTTATCCTTCCACCATCTCTCTCAGAGGAATG AGCGGGGAGGTTGGATTTACTGGTGACTGATTTTCTTTCATG GGCCAAGGAACTGAAAGAGAATGTGAAGCAAGGTTGTGTC TTGCGCATGGTTAAAAATAAAGCATTGTCCTGCTTCCTAAG ACTTAGACTGGGGTTGACAATTGTTTTAGCAACAAGACAAT TCAACTATTTCTCCTAGGATTTTTATTATTATTATTTTTTCAC TTTTCTACCAAATGGGTTACATAGGAAGAATGAACTGAAAT CTGTCCAGAGCTCCAAGTCCTTTGGAAGAAAGATTAGATGA ACGTAAAAATGTTGTTGTTTGCTGTGGCAGTTTACAGCATTT TTCTTGCAAAATTAGTGCAAATCTGTTGGAAATAGAACACA ATTCACAAATTGGAAGTGAACTAAAATGTAATGACGAAAA GGGAGTAGTGTTTTGATTTGGAGGAGGTGTATATTCGGCAG AGGTTGGACTGAGAGTTGGGTGTTATTTAACATAATTATGG TAATTGGGAAACATTTATAAACACTATTGGGATGGTGATAA AATACAAAAGGGCCTATAGATGTTAGAAATGGGTCAGGTTA CTGAAATGGGATTCAATTTGAAAAAAATTTTTTTAAATAGA

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Proteína TIGIT humano (Nº de Acesso GenBank NP_776160.2)	218	MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIIL QCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRV APGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLES SVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRI HSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQ RGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG
Proteína TIGIT de macaco Cynomolgus	219	MAFLVAPPMQFVYLLKTLCVFNMVFAKPGFSETVFSHRLSFTV LSAVGYFRWQKRPHLLPVSPLGRSMRWCLFLIWAQGLRQAPL ASGMMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWE QHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGLGLTLQSLTMN DTGEYFCTYHTYPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFQIPLLGA MAMMLVVICIAVIVVVVLARKKKSLRIHSVESGLQRKSTGQEE QIPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQQGDDCAELHDYFNVLSY RSLGSCSFFTETG
Proteína TIGIT de camundongo	220	MHGWLLLVWVQGLIQAAFLATGATAGTIDTKRNISAEEGGSV ILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQLLAIYSVDLGWHVASVFSD RVVPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGGIYKGRIFLKV QESSVAQFQTAPLGGTMAAVLGLICLMVTGVTVLARKKSIRM HSIESGLGRTEAEPQEWNLRSLSSPGSPVQTQTAPAGPCGEQAE DDYADPQEYFNVLSYRSLESFIAVSKTG
CDR1 de VH do Clone 2C	221	FTFTDYYMD
CDR2 de VH do Clone 2C	222	RTRNKVNSYYTEYAASVKG
CDR3 de VH do Clone 2C	223	ARGQYYYGSDRRGYYYMDV
CDR1 de VH dos Clones 13A, 13C e 13D	224	GTFLSSAIS
CDR2 de VH do Clone 13A	225	SLIPYFGTANYAQKFQG
CDR1 de VH do Clone 13B	226	GTFSAWAIS
CDR2 de VH dos Clones 13B e 13D	227	SIIPYFGKANYAQKFQG
CDR3 de VH do Clone 13B	228	ARGPSEVSGILGYVWFDP
CDR2 de VH do Clone 13C	229	SIIPLFGKANYAQKFQG
CDR3 de VH dos Clones 13C e 13D	230	ARGPSEVKGILGYVWFDP
CDR1 de VH do Clone 16C	231	GTFREYAIS
CDR2 de VH do Clone 16C	232	GIHPIFGTARYAQKFQG
CDR1 de VH dos Clones 16D e 16E	233	GTFSDYPIS
CDR2 de VH dos Clones 16B, 16D e 16E	234	GIIPIVGGANYAQKFQG
CDR3 de VH do Clone 16C	235	TRQSTWHKLYGTDV
CDR3 de VH do Clone 16D	236	TRQSTWHKLFGTDV
CDR3 de VH do Clone 16E	237	ARQSTWHKVYGTDV
CDR2 de VH do Clone 25A	238	WISAYNGNTKYAQKLQG
CDR1 de VH dos Clones 25B, 25C e 25D	239	YTFTSYPIG
CDR2 de VH dos Clones 25B, 25C e 25D	240	WISSYNGNTNYAQKLQG
CDR3 de VH do Clone 25C	241	ARGASSFWSGDVLGAFDI
CDR3 de VH do Clone 25D	242	ARDLKSFWSGDVLGAFDI
CDR1 de VH do Clone 25E	243	YTFTSYAIA
CDR3 de VH do Clone 25E	244	ARSGSSFWSGDVLGAFDI

Nome	SEQ ID NO	Sequência
VH do Clone 2C	245	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMDWVRQAP GKGLEWVGRTRNKVNSYYTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCARGQYYYGSDRRGYYYMDVWGQGTT VTVSS
VH do Clone 13A	246	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSAISWVRQAPG QGLEWMGSLIPYFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLVTVSS
VH do Clone 13B	247	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAWAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGPSEVSGILGYVWFDPWGQGTLVTVSS
VH do Clone 13C	248	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPLFGKANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGPSEVKGILGYVWFDPWGQGTLVTVSS
VH do Clone 13D	249	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGPSEVKGILGYVWFDPWGQGTLVTVSS
VH do Clone 16C	250	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFREYAISWVRQAPG QGLEWMGGIHPIFGTARYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCTRQSTWHKLYGTDVWGQGTTVTVSS
VH do Clone 16D	251	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYPISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIVGGANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCTRQSTWHKLFGTDVWGQGTTVTVSS
VH do Clone 16E	252	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYPISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIVGGANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARQSTWHKVYGTDVWGQGTTVTVSS
VH do Clone 25A	253	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDLSSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVSS
VH do Clone 25B	254	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYPIGWVRQAPG QGLEWMGWISSYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDLSSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVSS
VH do Clone 25C	255	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYPIGWVRQAPG QGLEWMGWISSYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARGASSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVSS
VH do Clone 25D	256	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYPIGWVRQAPG QGLEWMGWISSYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDLKSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVS S
VH do Clone 25E	257	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAIAWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARSGSSFWSGDVLGAFDIWGQGTMVTVSS
Epítopo hTIGIT 68-82	258	ICNADLGWHISPSFK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG1 do Clone 13 (e hIgG1 afucosilado) sequência de nucleotídeos; negrito indica a sequência de nucleotídeos da região variável (VH)	259	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATC ATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AGGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCA AGGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCAGGAG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCC CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTTTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCA AA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG1 do Clone 13 (e hIgG1 afucosilado); negrito indica VH	260	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLV TVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG1 LALA-PG do Clone 13; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	261	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATC ATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AGGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCA AGGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCAGGAG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCTGCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTTTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCA AA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG1 LALA-PG do Clone 13; negrito indica VH	262	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLV TVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG4 S228P do Clone 13; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	263	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATC ATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AGGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCA AGGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCCCCTTGCTCCAGAAGC ACATCTGAGAGCACAGCGGCCCTGGGATGCCTGGTCAAGG ACTATTTCCCTGAGCCGGTGACCGTAAGCTGGAACTCTGGA GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCA GTCTTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGTGTGGTGACTGTACC CTCCAGCAGCTTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTAG ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCAG AGTTCCTGGGGGGACCATCTGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGATACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCCCGAGGTCC AGTTCAACTGGTATGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCT AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAATGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAACCCCGGGAACCACAGGTATACACCCTGCCTCCATCCCA AGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTACCCCTCTGACATTGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACACCT CCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCCGG CTCACAGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCT TCTCCTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG4 S228P do Clone 13; negrito indica VH	264	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLV TVSS**ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13A; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	265	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCCTTAGCTCTGCTATCAGCTGGGTGCGACA GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATCTCTCA TCCCTTATTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCC AGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGCA CAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGTA GGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGGG ACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCAA GGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCAGGAGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTTTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13A; negrito indica VH	266	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSAISWVRQA PGQGLEWMGSLIPYFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTL VTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13B; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	267	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCTCTGCCTGGGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATCCATC ATCCCTTATTTTGGTAAGGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AAGTGGTATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGGG ACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCAA GGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCAGGAGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTTTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13B; negrito indica VH	268	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAWAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVSGILGYVWFDPWGQGTL VTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13C; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	269	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCCTTAGCTCTGCTATCAGCTGGGTGCGACA GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGTATCA TCCCTCTGTTTGGTAAGGCAAACTACGCACAGAAGTTCC AGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGCA CAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGTA AAGGGTATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGGG ACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCAA GGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCAGGAGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTTTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13C; negrito indica VH	270	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPLFGKANYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVKGILGYVWFDPWGQGTL VTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13D; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	271	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCCTTAGCTCTGCTATCAGCTGGGTGCGACA GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATCCATCA TCCCTTATTTTGGTAAGGCAAACTACGCACAGAAGTTCC AGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGCA CAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGTA AAGGGTATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGGG ACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAGCACCAA GGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCAGGAGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTTTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hIgG1 (e hIgG1 afucosilado) do Clone 13D; negrito indica VH	272	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVKGILGYVWFDPWGQGTL VTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia leve hkappa do Clone 13, 13A, 13B, 13C e 13D (e afucosilado); negrito indica a sequência de nucleotídeos de VL	273	**GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTC ACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGT CAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGAT TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCT GATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGA CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTT ATTACTGCATGCAGGCAAGACGAATCCCTATCACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA**CGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
Sequência de aminoácidos da cadeia leve hkappa do Clone 13, 13A, 13B, 13C e 13D (e afucosilado); negrito indica VL	274	**DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQARRIPITFGGGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de mIgG2a do Clone 13 (e afucosilado); negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	275	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATC ATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AGGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCAG**CTAAAACAA CAGCCCCATCGGTCTATCCGCTAGCCCCTGTGTGTGGAGAT ACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGG TTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTCTGGATC CCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTC TGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCTA GCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCAC CCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCA GAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCA GCACCTAACGCTGCTGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCAT AGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAG ATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACAC ACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTA CTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGAC TGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA AAGACCTCGGGGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACC CAAAGGCTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTC CACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGAC CTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGG AGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAA CACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTA CAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGA AATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAA TCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGCAAA

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de mIgG2a do Clone 13 (e afucosilado); negrito indica VH	276	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLV TVSS**AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCN VAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLG APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de mIgG2a LALA-PG do Clone 13; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	277	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATC ATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AGGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCTAAAACAA CAGCCCCATCGGTCTATCCGCTAGCCCCTGTGTGTGGAGAT ACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGG TTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTCTGGATC CCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTC TGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCTA GCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCAC CCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCA GAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCA GCACCTAACGCTGCTGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCAT AGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAG ATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACAC ACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTA CTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGAC TGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA AAGACCTCGGGGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACC CAAAGGCTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTC CACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGAC CTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGG AGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAA CACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTA CAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGA AATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAA TCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de mIgG2a LALA-PG do Clone 13; negrito indica VH	278	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLV TVSS**AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCN VAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLG APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de mIgG1 do Clone 13; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	279	**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGAC AGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATC ATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACTGCTGATGAATCCACCAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA CACTGCTGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCCTTCTGAAGT AGGAGCAATACTGGGATATGTATGGTTTGACCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA**GCCAAAACGA CACCCCCATCTGTCTATCCGCTAGCCCCTGGATCTGCTGCCC AAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGC TATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATC CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGGAGT CTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCA GCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCAC CCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCA GGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATCTGTACAGTCCCAGAA GTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTG CTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTA GACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTT TGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCC GGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAA CTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTT CAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCC ACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCA AGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTC CCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCC AGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGAACACG AATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAA GAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGT TACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTC TCCCACTCTCCTGGCAAA
Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de mIgG1 do Clone 13; negrito indica VH	280	**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLV TVSS**AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTV TWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCN VAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV LTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVE WQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAG NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

Nome	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de nucleotídeos da cadeia leve mKappa do Clone 13; negrito indica a sequência de nucleotídeos de VH	281	**GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTC ACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGT CAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGAT TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCT GATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGA CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTT ATTACTGCATGCAGGCAAGACGAATCCCTATCACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA**CGTGCAGATGCGG CGCCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTA ACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTC TACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAG TGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGG ACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCAC GTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCT GTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAG AGCTTCAACAGGAATGAGTGT
Sequência de aminoácidos da cadeia leve mKappa do Clone 13; negrito indica VL	282	**DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQARRIPITFGGGTKVEIKR**ADAAPTVSIFPPS SEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSW TDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNEC

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), em que os anticorpos têm uma afinidade de ligação (K_D) por TIGIT humano inferior a 5 nM e em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que os anticorpos têm uma K_D por TIGIT humano inferior a 1 nM.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que os anticorpos têm uma K_D por TIGIT humano inferior a 100 pM.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que os anticorpos exibem reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que os anticorpos exibem reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que os anticorpos bloqueiam a ligação de CD155 a TIGIT.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que os anticorpos bloqueiam a ligação de CD112 a TIGIT.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que os anticorpos bloqueiam a

ligação de CD155 e de CD112 a TIGIT.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que os anticorpos competem pela ligação a TIGIT humano com um anticorpo que compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que os anticorpos, quando ligados a TIGIT humano, ligam-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que os anticorpos se ligam a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

12. Composição de acordo com a reivindicação 10 ou reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que os anticorpos se ligam a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que os anticorpos, quando ligados a TIGIT humano, ligam-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

15. Composição de acordo com a reivindicação 14,

caracterizada pelo fato de que os anticorpos se ligam a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

16. Composição de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

17. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que os anticorpos se ligam a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados.

18. Composição de acordo com a reivindicação 13 ou 17, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende Phe na posição 81.

19. Composição de acordo com a reivindicação 13, 17 ou 18, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende Lys ou Ser na posição 82.

20. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 17 a 19, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82.

21. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende Phe81 e Lys82.

22. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 17 a 21, caracterizada pelo fato de que o epítopo é um epítopo descontínuo.

23. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 17 a 22, caracterizada pelo fato de que os anticorpos se ligam a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda uma ou mais das posições de aminoácidos 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84,

85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 ou 93.

24. Composição de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

25. Composição de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

26. Composição de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 e Ala86.

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 17 a 26, caracterizada pelo fato de que o epítopo compreende a sequência ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO: 258).

28. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizada pelo fato de que TIGIT humano compreende as sequência de SEQ ID NO: 218.

29. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma ou mais dentre:

(a) uma CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID

NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 e SEQ ID NO:295;

(c) uma CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 e SEQ ID NO:296;

(d) uma CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 e SEQ ID NO:287;

(e) uma CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 e SEQ ID NO:288; ou

(f) uma CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 e SEQ ID NO:215.

30. Composição de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 e SEQ ID NO:295;

(c) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 e SEQ ID NO:296;

(d) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:67 e SEQ ID NO:287;

(e) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:69 e SEQ ID NO:288; e/ou

(f) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

31. Composição de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da

cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 22, 24, 26, 31, 33 e 35, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 40, 42, 44, 49, 51 e 53, respectivamente; ou

(d) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(e) SEQ ID NOs: 283, 285, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(f) SEQ ID NOs: 284, 60, 286, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(g) SEQ ID NOs: 76, 78, 80, 85, 87 e 89, respectivamente; ou

(h) SEQ ID NOs: 94, 96, 98, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(i) SEQ ID NOs: 112, 114, 116, 121, 123 e 125, respectivamente; ou

(j) SEQ ID NOs: 130, 132, 134, 139, 141 e 143, respectivamente; ou

(k) SEQ ID NOs: 148, 150, 152, 157, 159 e 161, respectivamente; ou

(l) SEQ ID NOs: 166, 168, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(m) SEQ ID NOs: 184, 186, 188, 193, 195 e 197, respectivamente; ou

(n) SEQ ID NOs: 202, 204, 206, 211, 213 e 215, respectivamente; ou

(o) SEQ ID NOs: 221, 222, 223, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(p) SEQ ID NOs: 224, 225, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(q) SEQ ID NOs: 293, 297, 62, 287, 288 e 71,

respectivamente; ou

(r) SEQ ID NOs: 294, 225, 286, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(s) SEQ ID NOs: 226, 227, 228, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(t) SEQ ID NOs: 289, 291, 228, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(u) SEQ ID NOs: 290, 227, 292, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(v) SEQ ID NOs: 224, 229, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(w) SEQ ID NOs: 293, 295, 230, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(x) SEQ ID NOs: 294, 229, 296, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(y) SEQ ID NOs: 224, 227, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(z) SEQ ID NOs: 293, 290, 230, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(aa) SEQ ID NOs: 294, 290, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(bb) SEQ ID NOs: 231, 232, 235, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(cc) SEQ ID NOs: 233, 234, 236, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(dd) SEQ ID NOs: 233, 234, 237, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(ee) SEQ ID NOs: 166, 238, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(ff) SEQ ID NOs: 239, 240, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(gg) SEQ ID NOs: 239, 240, 241, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(hh) SEQ ID NOs: 239, 240, 242, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(ii) SEQ ID NOs: 243, 168, 244, 175, 177 e 179, respectivamente.

32. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 283, 285, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 284, 60, 286, 67, 69 e 71, respectivamente.

33. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257; e/ou

(b) uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência

com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208.

34. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência

com SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com

pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:208.

35. Composição de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:208.

36. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64.

37. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são anticorpos IgG.

38. Composição de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são anticorpos IgG1 ou anticorpos IgG3.

39. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

40. Composição de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

41. Composição de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

42. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados e em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

43. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, em que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados e em que cada um dos anticorpos compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

44. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 43, caracterizada pelo fato de que os anticorpos exibem sinergia com um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

45. Composição de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a sinergia é determinada por meio de um ensaio que compreende colocar em contato uma cocultura compreendendo (i) células Jurkat efetoras que expressam PD-1, TIGIT e CD226, em que as células Jurkat efetoras compreendem um gene repórter luciferase direcionado pelo promotor de IL-2; e (ii) células CHO-K1 apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) expressando um ativador de TCR, PD-L1 e CD155; com a composição e um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

46. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 45, caracterizada pelo fato de que células T reguladoras

(Treg) são depletadas de PBMCs humanas quando em contato com a composição.

47. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, caracterizada pelo fato de que a expressão de MCP1, IL-8 e MIP1α é aumentada em PBMCs humanas quando em contato com a composição.

48. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizada pelo fato de que monócitos/macrófagos são ativados quando em contato com a composição.

49. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 48, caracterizada pelo fato de que CD86 e MHCII são regulados positivamente quando monócitos/macrófagos CD14+ estão em contato com a composição.

50. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, caracterizada pelo fato de que monócitos/macrófagos CD14+ quando em contato com a composição amadurecem tornando-se células apresentadoras de antígeno.

51. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 50, caracterizada pelo fato de que as células T de memória quando em contato com a composição mostram produção aumentada de IFNγ em resposta ao antígeno.

52. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 to 51, caracterizada pelo fato de que as células T de memória quando em contato com a composição demonstram resposta reforçada ao antígeno.

53. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 52, caracterizada pelo fato de que células T CD8+ efetoras de memória e/ou células T CD4+ efetoras de memória são aumentadas em tumores quando em contato com a composição.

54. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 53, caracterizada pelo fato de que a composição reforça uma resposta Th1 em um animal a que foi administrada a composição.

55. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, caracterizada pelo fato de que os anticorpos da composição têm menor afinidade de ligação por FcγRIIa e/ou FcγRIIb quando comparados aos mesmos anticorpos anti-TIGIT que não são afucosilados.

56. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, caracterizada pelo fato de que a composição medeia a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) de células que expressam TIGIT na presença de monócitos-macrófagos.

57. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são monoclonais.

58. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são anticorpos totalmente humanos.

59. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são anticorpos quiméricos.

60. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28 ou 44 a 59, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são humanizados.

61. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são fragmentos de anticorpo.

62. Composição de acordo com a reivindicação 61, caracterizada pelo fato de que os fragmentos de anticorpo são Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv ou diabodies.

63. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 62, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são anticorpos biespecíficos.

64. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são conjugados anticorpo-fármaco.

65. Anticorpo que se liga ao TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM), caracterizado pelo fato de que o anticorpo tem uma afinidade de ligação (K_D) por TIGIT humano inferior a 5 nM e em que o anticorpo é afucosilado.

66. Anticorpo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o anticorpo tem uma K_D por TIGIT humano inferior a 1 nM.

67. Anticorpo de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo tem uma K_D por TIGIT humano inferior a 100 pM.

68. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 67, caracterizado pelo fato de que o anticorpo exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e/ou com TIGIT de camundongo.

69. Anticorpo de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o anticorpo exibe reatividade cruzada com TIGIT de macaco Cynomolgus e com TIGIT de camundongo.

70. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 69, caracterizado pelo fato de que o anticorpo bloqueia a ligação de CD155 a TIGIT.

71. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 70, caracterizado pelo fato de que o anticorpo bloqueia a ligação de CD112 a TIGIT.

72. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 71, caracterizado pelo fato de que o anticorpo bloqueia a ligação de

ambos, CD155 e CD112, a TIGIT.

73. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 72, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compete pela ligação a TIGIT humano com um anticorpo que compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

74. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 73, caracterizado pelo fato de que, quando ligado a TIGIT humano, liga-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

75. Anticorpo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

76. Anticorpo de acordo com a reivindicação 74 ou 75, caracterizado pelo fato de que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

77. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 76, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

78. Anticorpo que se liga ao TIGIT humano, caracterizado pelo fato de que, quando ligado a TIGIT humano, liga-se a uma ou a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que o anticorpo é afucosilado.

79. Anticorpo de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos.

80. Anticorpo de acordo com a reivindicação 78 ou 79, caracterizado pelo fato de que as posições 81 e 82 de aminoácidos são Phe81 e Lys82.

81. Anticorpo que se liga ao TIGIT humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo em TIGIT humano que compreende uma ou ambas as posições 81 e 82 de aminoácidos e em que o anticorpo é afucosilado.

82. Anticorpo de acordo com a reivindicação 77 ou 81, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende Phe na posição 81.

83. Anticorpo de acordo com a reivindicação 77, 81 ou 82, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende Lys ou Ser na posição 82.

84. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 ou 81 a 83, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende Phe na posição 81 e Lys ou Ser na posição 82.

85. Anticorpo de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende Phe81 e Lys82.

86. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 ou 81 a 85, caracterizado pelo fato de que o epítopo é um epítopo descontínuo.

87. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 ou 81 a 86, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo em TIGIT humano que compreende ainda uma ou mais das posições de aminoácidos 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 ou 93.

88. Anticorpo de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

89. Anticorpo de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Thr51,

Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 e Leu93.

90. Anticorpo de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 e Ala86.

91. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 ou 81 a 90, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende a sequência ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO: 258).

92. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 91, caracterizado pelo fato de que TIGIT humano compreende a sequência de SEQ ID NO: 218.

93. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 92, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma ou mais dentre:

(a) uma CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238, SEQ ID

NO:240, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:291 e SEQ ID NO:295;

(c) uma CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:292 e SEQ ID NO:296;

(d) uma CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:211 e SEQ ID NO:287;

(e) uma CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:213 e SEQ ID NO:288; ou

(f) uma CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência selecionada dentre SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 e SEQ ID NO:215.

94. Anticorpo de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma sequência de CDR1 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:293, SEQ ID

NO:294, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:289 e SEQ ID NO:290;

(b) uma sequência de CDR2 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:229 e SEQ ID NO:295;

(c) uma sequência de CDR3 da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:230 e SEQ ID NO:296;

(d) uma sequência de CDR1 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:67 e SEQ ID NO:287;

(e) uma sequência de CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO:69 e SEQ ID NO:288; e/ou

(f) uma sequência de CDR3 da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

95. Anticorpo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 22, 24, 26, 31, 33 e 35, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 40, 42, 44, 49, 51 e 53, respectivamente; ou

(d) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(e) SEQ ID NOs: 76, 78, 80, 85, 87 e 89, respectivamente; ou

(f) SEQ ID NOs: 94, 96, 98, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(g) SEQ ID NOs: 112, 114, 116, 121, 123 e 125,

respectivamente; ou

(h) SEQ ID NOs: 130, 132, 134, 139, 141 e 143, respectivamente; ou

(i) SEQ ID NOs: 148, 150, 152, 157, 159 e 161, respectivamente; ou

(j) SEQ ID NOs: 166, 168, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(k) SEQ ID NOs: 184, 186, 188, 193, 195 e 197, respectivamente; ou

(l) SEQ ID NOs: 202, 204, 206, 211, 213 e 215, respectivamente; ou

(m) SEQ ID NOs: 221, 222, 223, 13, 15 e 17, respectivamente; ou

(n) SEQ ID NOs: 224, 225, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(o) SEQ ID NOs: 226, 227, 228, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(p) SEQ ID NOs: 224, 229, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(q) SEQ ID NOs: 224, 227, 230, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(r) SEQ ID NOs: 231, 232, 235, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(s) SEQ ID NOs: 233, 234, 236, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(t) SEQ ID NOs: 233, 234, 237, 103, 105 e 107, respectivamente; ou

(u) SEQ ID NOs: 166, 238, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(v) SEQ ID NOs: 239, 240, 170, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(w) SEQ ID NOs: 239, 240, 241, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(x) SEQ ID NOs: 239, 240, 242, 175, 177 e 179, respectivamente; ou

(y) SEQ ID NOs: 243, 168, 244, 175, 177 e 179, respectivamente.

96. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 95, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve compreendendo as sequências de:

(a) SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 67, 69 e 71, respectivamente; ou

(b) SEQ ID NOs: 283, 285, 62, 287, 288 e 71, respectivamente; ou

(c) SEQ ID NOs: 284, 60, 286, 67, 69 e 71, respectivamente.

97. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 96, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257; e/ou

(b) uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ

ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 ou SEQ ID NO:208.

98. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 97, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de

sequência com SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma

sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO:208.

99. Anticorpo de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:245 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10; ou

(b) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:19 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:28; ou

(c) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:37 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:46; ou

(d) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 ou SEQ ID NO:249 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64; ou

(e) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:73 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82; ou

(f) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 ou SEQ ID NO:252 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou

(g) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:118; ou

(h) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:127 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:136; ou

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:145 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:154; ou

(j) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 ou SEQ ID NO:257 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:172; ou

(k) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:181 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:190; ou

(l) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:199 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:208.

100. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 99, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:55 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:64.

101. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 100, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo IgG.

102. Anticorpo de acordo com a reivindicação 101, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo IgG1 ou um anticorpo IgG3.

103. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 102, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

104. Anticorpo de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

105. Anticorpo de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

106. Anticorpo que se liga ao TIGIT humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 266, 268, 270 e 272; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

107. Anticorpo que se liga ao TIGIT humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

108. Anticorpo que se liga ao TIGIT humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 260; e uma cadeia leve que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 274.

109. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 108, caracterizado pelo fato de que o anticorpo exibe sinergia com um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

110. Anticorpo de acordo com a reivindicação 109, caracterizado pelo fato de que a sinergia é determinada por meio de um ensaio que compreende colocar em contato uma cocultura compreendendo (i) células Jurkat efetoras que expressam PD-1, TIGIT e CD226, em que as células Jurkat efetoras compreendem um gene repórter luciferase direcionado pelo promotor de IL-2; e (ii) células CHO-K1 apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) expressando um ativador de TCR, PD-L1 e CD155; com a composição e um anticorpo anti-PD-1 ou um anticorpo anti-PD-L1.

111. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 110, caracterizado pelo fato de que células T reguladoras (Treg) são depletadas de PBMCs humanas quando em contato com o anticorpo.

112. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 111, caracterizado pelo fato de que a expressão de MCP1, IL-8 e MIP1α é aumentada em PBMCs humanas quando em contato com o anticorpo.

113. Anticorpo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 65 a 112, caracterizado pelo fato de que monócitos/macrófagos são ativados quando estão em contato com o anticorpo.

114. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 113, caracterizado pelo fato de que CD86 e MHCII são regulados positivamente quando monócitos/macrófagos CD14+ estão em contato com o anticorpo.

115. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 114, caracterizado pelo fato de que monócitos/macrófagos CD14+ quando em contato com o anticorpo amadurecem tornando-se células apresentadoras de antígeno.

116. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 115, caracterizado pelo fato de que as células T de memória quando em contato com o anticorpo mostram produção aumentada de IFNγ em resposta ao antígeno.

117. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 116, caracterizado pelo fato de que as células T de memória quando em contato com o anticorpo demonstram resposta reforçada ao antígeno.

118. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 117, caracterizado pelo fato de que células T CD8+ efetoras de memória e/ou células T CD4+ efetoras de memória são aumentadas em tumores quando estão em contato com o anticorpo.

119. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 118, caracterizado pelo fato de que o anticorpo reforça uma resposta Th1 em um animal a que foi administrado o anticorpo.

120. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 119, caracterizado pelo fato de que o anticorpo tem menor afinidade de ligação por FcγRIIa e/ou FcγRIIb quando comparado ao mesmo anticorpo anti-TIGIT que não é afucosilado.

121. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 120, caracterizado pelo fato de que a composição medeia a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) de células que expressam TIGIT na presença de monócitos-macrófagos.

122. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 121, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é monoclonal.

123. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 122, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo totalmente humano.

124. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 123, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico.

125. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 92 ou109 a 124, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é humanizado.

126. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 125, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um fragmento de anticorpo.

127. Anticorpo de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo is a Fab, a Fab', a $F(ab')_2$, a scFv, ou a diabody.

128. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 127, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo biespecífico.

129. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 128, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um conjugado anticorpo-fármaco.

130. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de que

compreende a composição definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 64 ou o anticorpo definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 129 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

131. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que codifica (i) a cadeia pesada do anticorpo definido em qualquer uma das reivindicações 106 a 108; (ii) a cadeia leve do anticorpo definido em qualquer uma das reivindicações 106 a 108; ou (iii) a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 106 a 108.

132. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende (i) uma sequência de nucleotídeos selecionada dentre SEQ ID NOs: 259, 261, 163, 265, 267, 269 e 271; ou (ii) uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 273; ou (iii) uma sequência de nucleotídeos selecionada dentre SEQ ID NOs: 259, 261, 263, 265, 267, 269 e 271 e uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 273.

133. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 131 ou 132.

134. Célula hospedeira isolada, caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo isolado como definido na reivindicação 131 ou 132 ou o vetor como definido na reivindicação 133.

135. Célula hospedeira isolada, caracterizada pelo fato de que expressa o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 106 a 108.

136. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 134 ou 135, caracterizada pelo fato de que é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

137. Método para a produção de um anticorpo que se liga ao TIGIT humano, caracterizado pelo fato de que compreende incubar a célula hospedeira como definida em qualquer uma das reivindicações 134 a 136 sob

condições adequadas para a produção do anticorpo.

138. Método de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

139. Método de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é cultivada na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados.

140. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 137 a 139, caracterizado pelo fato de que compreende ainda isolar os anticorpos.

141. Composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 138 a 140.

142. Composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos pelo método que compreende incubar a célula hospedeira, como definida na reivindicação 134 ou 135, sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados e isolar os anticorpos para formar a composição de anticorpos isolados.

143. Composição de acordo com a reivindicação 142, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

144. Composição de acordo com a reivindicação 142, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é cultivada na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados.

145. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica (i) os anticorpos da composição definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 63 ou (ii) o anticorpo com definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 128, em que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

146. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 145, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo é um vetor.

147. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que expressa (i) os anticorpos da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 63 ou (ii) o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 128, em que a célula hospedeira é projetada para produzir anticorpos afucosilados.

148. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 145 a 147, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira compreende:

(a) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:269 ou SEQ ID NO:271; e/ou

(b) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:209 ou SEQ ID NO:273.

149. Método para a produção de anticorpos afucosilados que se ligam a TIGIT, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira definida em qualquer uma das reivindicações 145 a 148 sob condições adequadas para a produção dos anticorpos afucosilados.

150. Método para a produção de anticorpos afucosilados que se ligam a TIGIT, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira compreende um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica (i) os anticorpos da composição como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 63 ou (ii) o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 128.

151. Método de acordo com a reivindicação 150, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é um vetor.

152. Método para a produção de anticorpos afucosilados que se ligam a TIGIT, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira expressa (i) os anticorpos da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 63 ou (ii) o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 128.

153. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 150 a 152, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende:

(a) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:269 ou SEQ ID NO:271; e/ou

(b) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:11, SEQ ID

NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:209 ou SEQ ID NO:273.

154. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 150 a 153, caracterizado pelo fato de que o análogo de fucose é 2-fluorofucose.

155. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 149 a 154, caracterizado pelo fato de que compreende ainda isolar os anticorpos afucosilados.

156. Composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 149 a 155.

157. Composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos por um método que compreende incubar a célula hospedeira, como definida em qualquer uma das reivindicações 145 a 147, sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados e isolar os anticorpos para formar a composição de anticorpos isolados.

158. Composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos

anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos por um método que compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira compreende um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica (i) os anticorpos da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 63 ou (ii) o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 128.

159. Composição de anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados, em que os anticorpos são produzidos por um método que compreende cultivar uma célula hospedeira na presença de um análogo de fucose sob condições adequadas para a produção de anticorpos afucosilados, em que a célula hospedeira expressa (i) os anticorpos da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 63 ou (ii) o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 128.

160. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende:

a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 64, o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 129 ou a composição farmacêutica como definida na reivindicação 130; e

um agente terapêutico adicional.

161. Kit de acordo com a reivindicação 160, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um agente antineoplásico.

162. Kit de acordo com a reivindicação 160 ou reivindicação 161, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um

anticorpo.

163. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 160 a 162, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um antagonista ou um inibidor de um coinibidor de células T; um agonista de um coativador de células T; uma citocina imunoestimuladora; ou SGN-2FF.

164. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 160 a 163, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional se liga a uma proteína selecionada dentre CD25, PD-1, PD-L1, Tim3, Lag3, CTLA4, 41BB, OX40, CD3, CD40, CD47M, GM-CSF, CSF1R, TLR, STING, RIGI, TAM receptor quinase, NKG2A, NKG2D, GD2, HER2, EGFR, PDGFRα, SLAMF7, VEGF, CTLA-4, CD20, cCLB8, KIR e CD52.

165. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 160 a 164, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-Tim3, anticorpo anti-Lag3, anticorpo anti-CTLA4, anticorpo anti-41BB, anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD47M, anticorpo anti-CSF1R, anticorpo anti-TLR, anticorpo anti-STING, anticorpo anti-RIGI, anticorpo anti-receptor quinase TAM, anticorpo anti-NKG2A, um anticorpo anti-NKG2D, um anticorpo anti-GD2, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-PDGFR-α, um anticorpo anti-SLAMF7, um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-cCLB8, um anticorpo anti-KIR e um anticorpo anti-CD52.

166. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 160 a 165, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional compreende uma citocina selecionada dentre IL-15, IL-21, IL-2, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-1, IL-3, IL-12 e IFNγ.

167. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 160 a 165, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é

selecionado dentre SEA-CD40, avelumabe, durvalumabe, nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, atezolizumabe, Hul4.18K322A, Hu3F8, dinituximabe, trastuzumabe, cetuximabe, olaratumabe, necitumumabe, elotuzumabe, ramucirumabe, pertuzumabe, ipilimumabe, bevacizumabe, rituximabe, obinutuzumabe, siltuximabe, ofatumumabe, lirilumabe e alentuzumabe.

168. Kit de acordo com a reivindicação 160 ou reivindicação 161, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um agente alquilante (p. ex., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, bussulfano, melfalano, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosureias ou temozolomida), uma antraciclina (p. ex., doxorrubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirrubicina ou mitoxantrona), um desorganizador do citoesqueleto (p. ex., paclitaxel ou docetaxel), um inibidor de histona desacetilase (p. ex., vorinostat ou romidepsina), um inibidor de topoisomerase (p. ex., irinotecano, topotecano, ansacrina, etoposídeo ou teniposídeo), um inibidor de quinase (p. ex., bortezomibe, erlotinibe, gefitinibe, imatinibe, vemurafenibe ou vismodegibe), um análogo de nucleosídeo ou análogo do precursor (p. ex., azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, mercaptopurina, metotrexato ou tioguanina), um antibiótico peptídico (p. ex., actinomicina ou bleomicina), um agente à base de platina (p. ex., cisplatina, oxaloplatina ou carboplatina) ou um alcaloide de planta (p. ex., vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel ou docetaxel), galardina, talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

169. Método para o tratamento de um câncer em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 64, do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 129 ou da composição farmacêutica

como definida na reivindicação 130.

170. Método de acordo com a reivindicação 169, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer que é enriquecido com a expressão de CD112 ou CD155.

171. Método de acordo com a reivindicação 169 ou 170, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer que é enriquecido com células T ou células *natural killer* (NK) que expressam TIGIT.

172. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 169 a 171, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de útero, câncer cervical, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de testículo, câncer de esôfago, câncer gastrointestinal, câncer gástrico, câncer de pâncreas, câncer colorretal, câncer de cólon, câncer de rim, carcinoma renal de células claras, câncer da cabeça e pescoço, câncer de pulmão, adenocarcinoma de pulmão, câncer de estômago, câncer de células germinativas, câncer ósseo, câncer de fígado, câncer de tireoide, câncer de pele, melanoma, neoplasia do sistema nervoso central, mesotelioma, linfoma, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin, mieloma ou sarcoma.

173. Método de acordo com a reivindicação 172, caracterizado pelo fato de que o câncer é linfoma, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular ou linfoma de Hodgkin.

174. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 169 a 173, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico adicional.

175. Método de acordo com a reivindicação 174, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um agente antineoplásico.

176. Método de acordo com a reivindicação 174 ou

reivindicação 175, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um anticorpo.

177. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 174 a 176, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um antagonista ou um inibidor de um coinibidor de células T; um agonista de um coativador de células T; ou uma citocina imunoestimuladora; ou SGN-2FF.

178. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 174 a 177, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional se liga a uma proteína selecionada dentre CD25, PD-1, PD-L1, Tim3, Lag3, CTLA4, 41BB, OX40, CD3, CD40, CD47M, GM-CSF, CSF1R, TLR, STING, RIGI, TAM receptor quinase, NKG2A, NKG2D, GD2, HER2, EGFR, PDGFRα, SLAMF7, VEGF, CTLA-4, CD20, cCLB8, KIR e CD52.

179. Método de acordo com a reivindicação 178, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-Tim3, anticorpo anti-Lag3, anticorpo anti-CTLA4, anticorpo anti-41BB, anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD47M, anticorpo anti-CSF1R, anticorpo anti-TLR, anticorpo anti-STING, anticorpo anti-RIGI, anticorpo anti-receptor quinase TAM, anticorpo anti-NKG2A, um anticorpo anti-NKG2D, um anticorpo anti-GD2, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-PDGFR-α, um anticorpo anti-SLAMF7, um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-cCLB8, um anticorpo anti-KIR e um anticorpo anti-CD52.

180. Método de acordo com a reivindicação 174 ou reivindicação 175, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional compreende uma citocina selecionada dentre IL-15, IL-21, IL-2, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-1, IL-3, IL-12 e IFNγ.

181. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

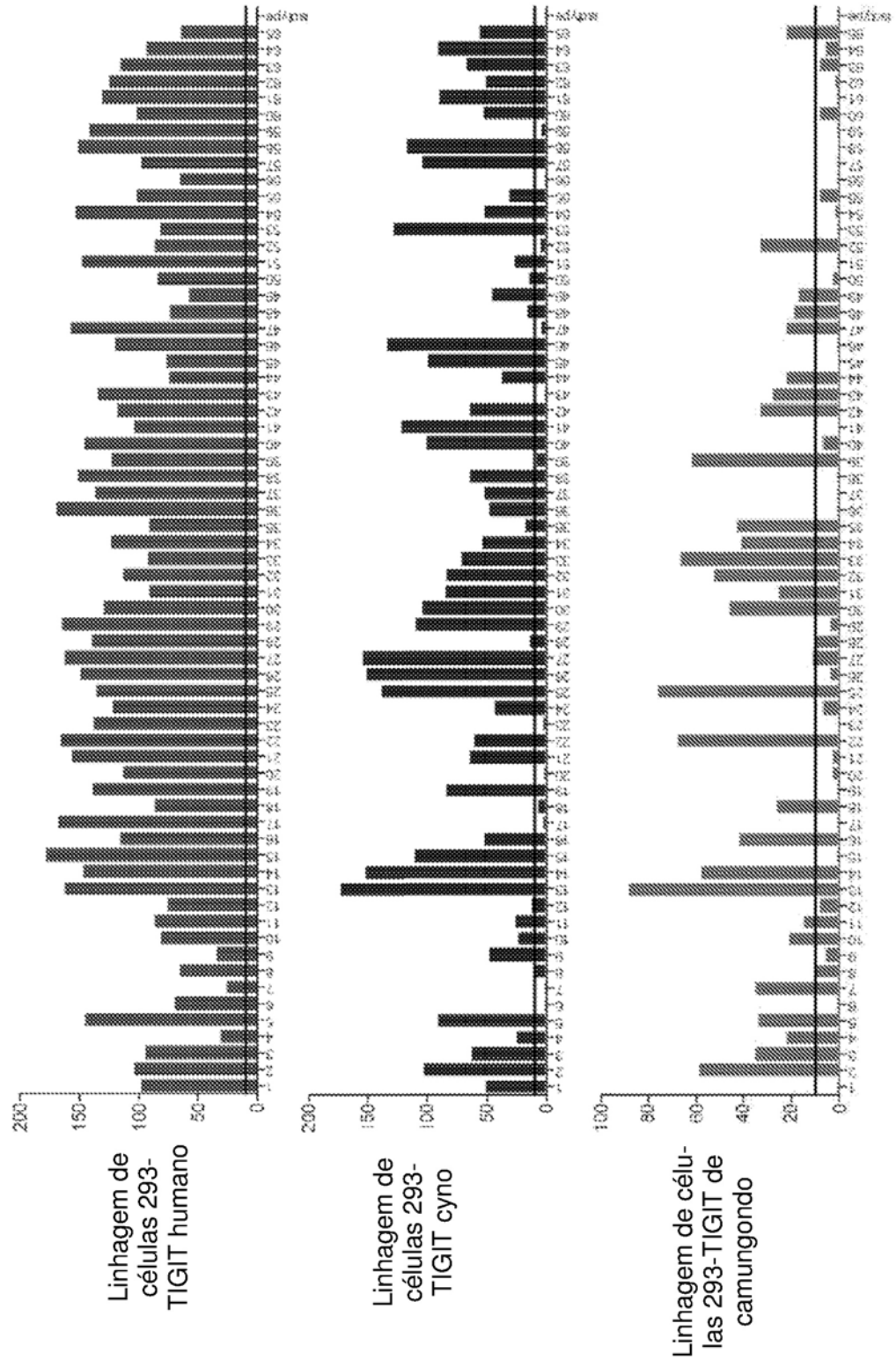
174 a 179, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre SEA-CD40, avelumabe, durvalumabe, nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, atezolizumabe, Hul4.18K322A, Hu3F8, dinituximabe, trastuzumabe, cetuximabe, olaratumabe, necitumumabe, elotuzumabe, ramucirumabe, pertuzumabe, ipilimumabe, bevacizumabe, rituximabe, obinutuzumabe, siltuximabe, ofatumumabe, lirilumabe e alentuzumabe.

182 Método de acordo com a reivindicação 174 ou 175, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é selecionado dentre um agente alquilante (p. ex., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, bussulfano, melfalano, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosureias ou temozolomida), uma antraciclina (p. ex., doxorrubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirrubicina ou mitoxantrona), um desorganizador do citoesqueleto (p. ex., paclitaxel ou docetaxel), um inibidor de histona desacetilase (p. ex., vorinostat ou romidepsina), um inibidor de topoisomerase (p. ex., irinotecano, topotecano, ansacrina, etoposídeo ou teniposídeo), um inibidor de quinase (p. ex., bortezomibe, erlotinibe, gefitinibe, imatinibe, vemurafenibe ou vismodegibe), um análogo de nucleosídeo ou análogo do precursor (p. ex., azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, mercaptopurina, metotrexato ou tioguanina), um antibiótico peptídico (p. ex., actinomicina ou bleomicina), um agente à base de platina (p. ex., cisplatina, oxaloplatina ou carboplatina) ou um alcaloide de planta (p. ex., vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel ou docetaxel), galardina, talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

183. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 174 a 182, caracterizado pelo fato de que a composição, o anticorpo ou a composição farmacêutica é administrado simultaneamente com o agente terapêutico adicional.

184. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 174 a 183, caracterizado pelo fato de que a composição, o anticorpo ou a composição farmacêutica é administrado sequencialmente ao agente terapêutico adicional.

Figura 1


Linhagem de células 293-TIGIT humano
Linhagem de células 293-TIGIT cyno
Linhagem de células 293-TIGIT de camungondo

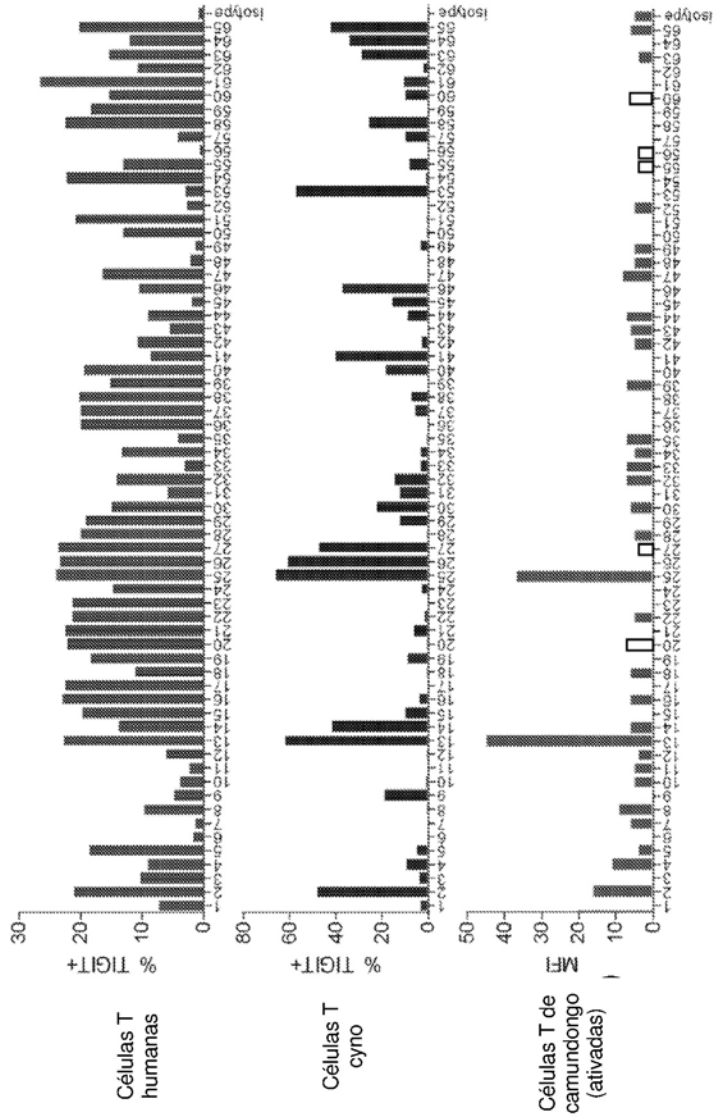

Células T humanas
% TIGIT+
Células T cyno
% TIGIT+
Células T de camundongo (ativadas)
MFI
isotype

Figura 2

Figura 3B

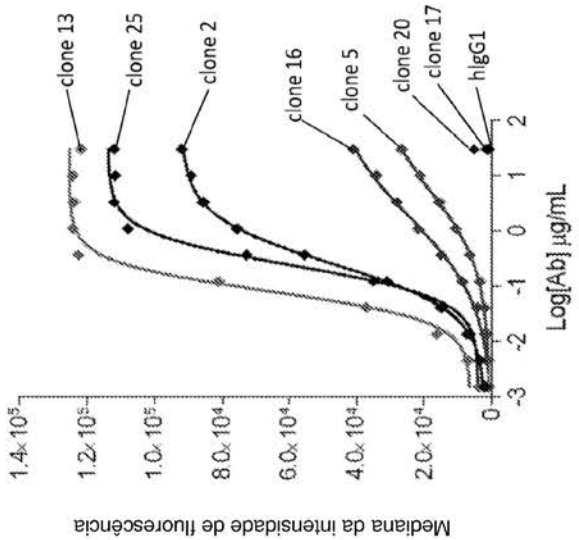
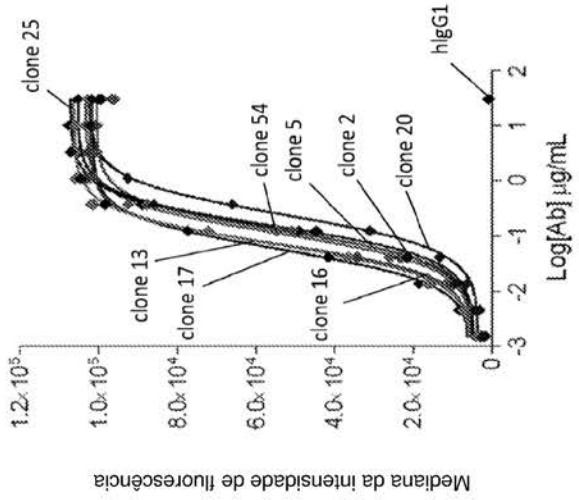


Figura 3A



Petição 870210016809, de 19/02/2021, pág. 288/350

Figura 3C

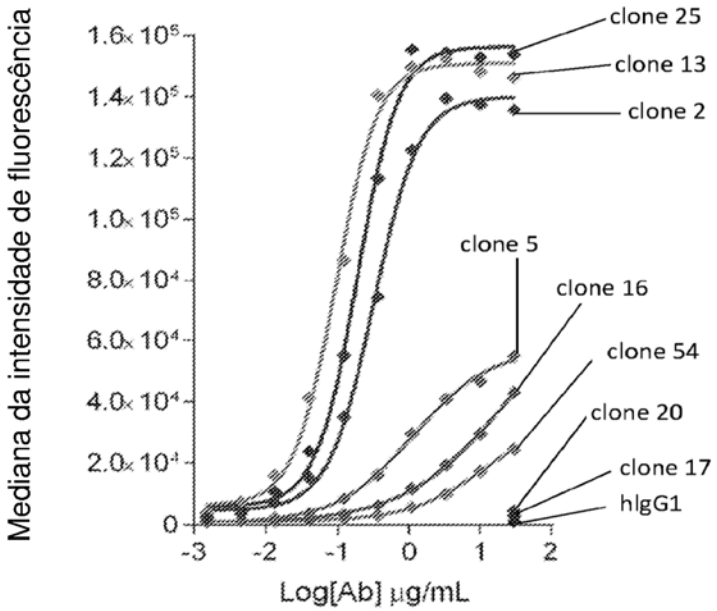


Figura 3D

EC50s (mg/mL)

	Clone 2	Clone 5	Clone 13	Clone 16	Clone 17	Clone 20	Clone 25	Clone 54
Humano	0,15	0,12	0,07	0,07	0,06	0,24	0,14	0,11
Camundongo	0,25	5,39	0,08	0,08			0,24	
Cyno	0,32	1,17	0,10	0,10			0,19	11,44

Figura 4

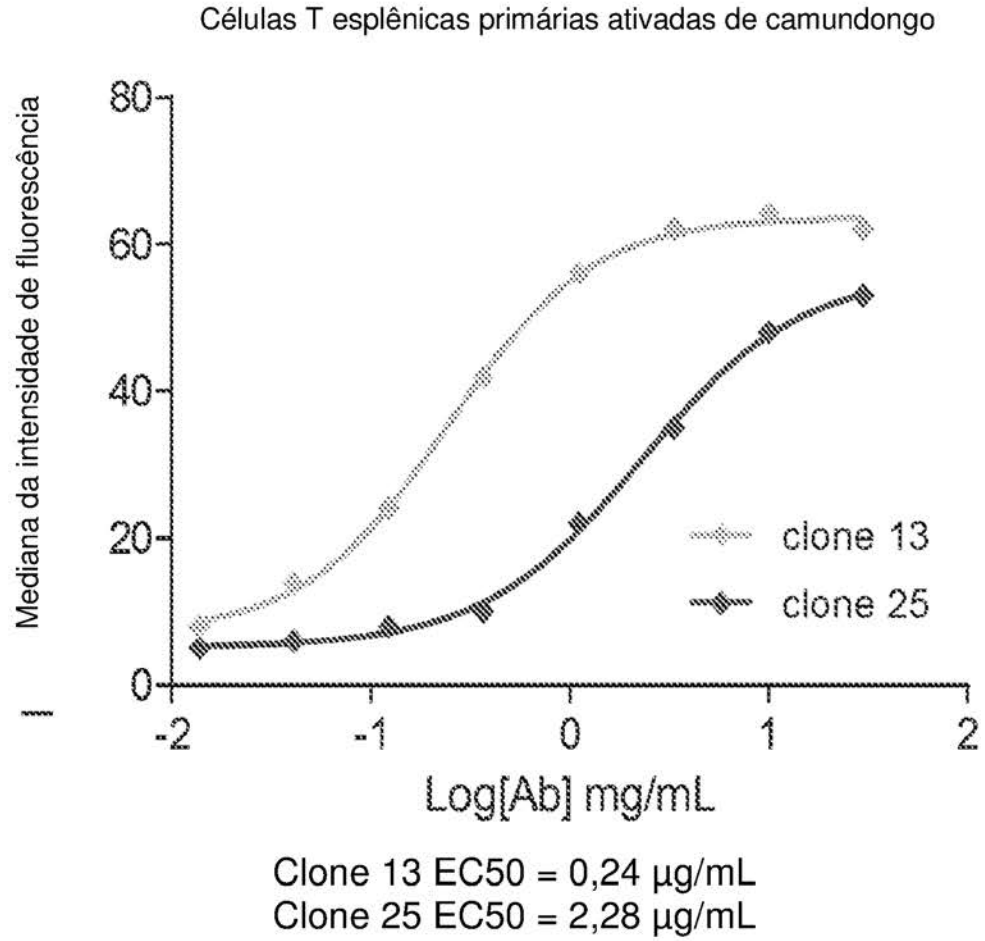

Células T esplênicas primárias ativadas de camundongo
Mediana da intensidade de fluorescência
80
60
40
20
0
-2
-1
0
1
2
Log[Ab] mg/mL
clone 13
clone 25
Clone 13 EC50 = 0,24 µg/mL
Clone 25 EC50 = 2,28 µg/mL

Figura 5B

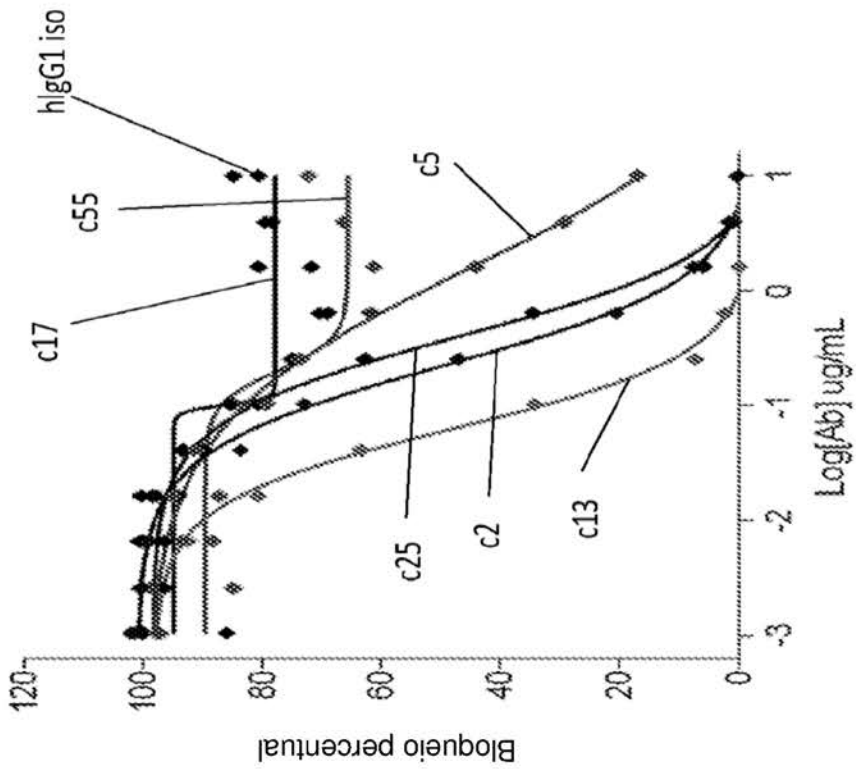
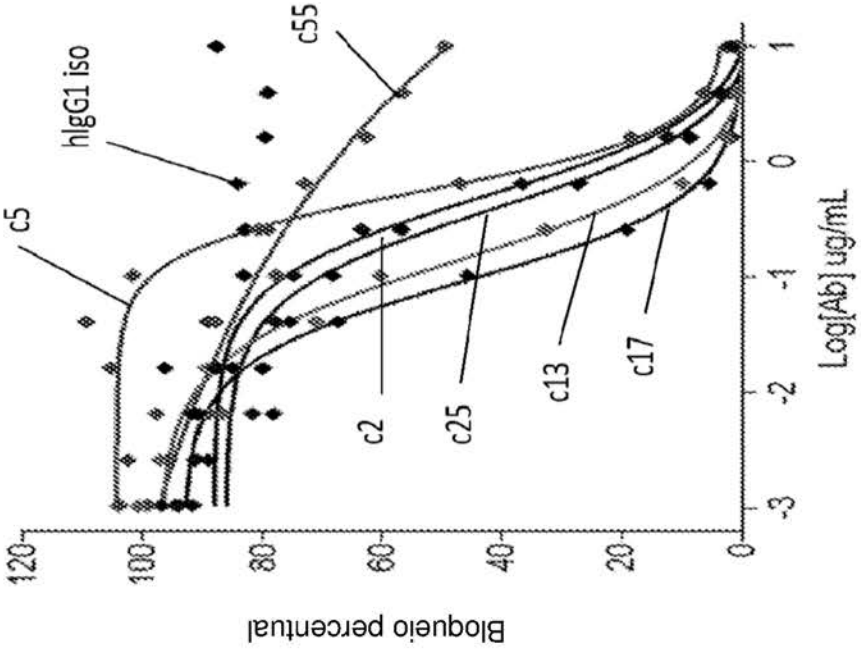


Figura 5A



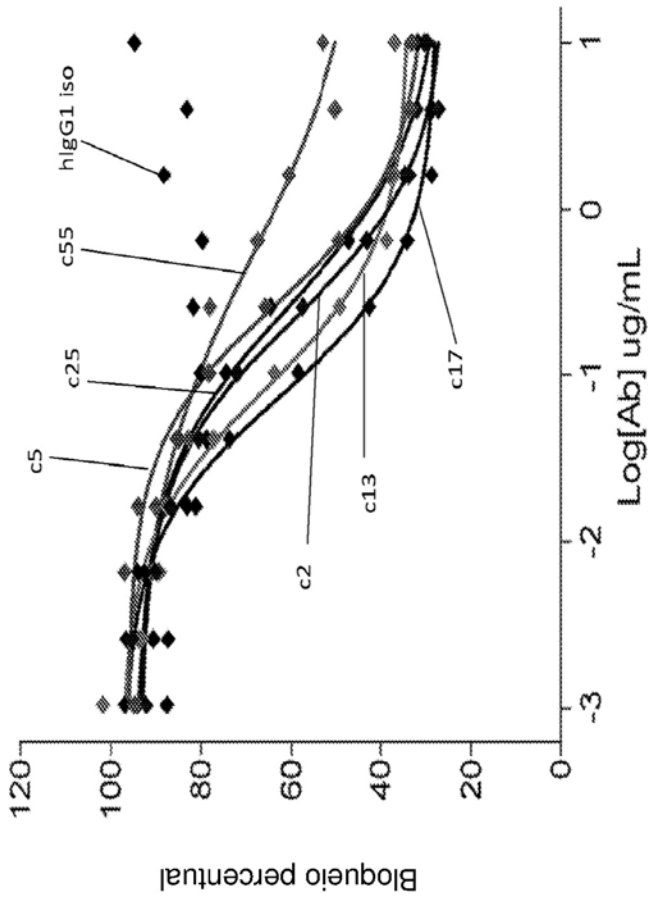
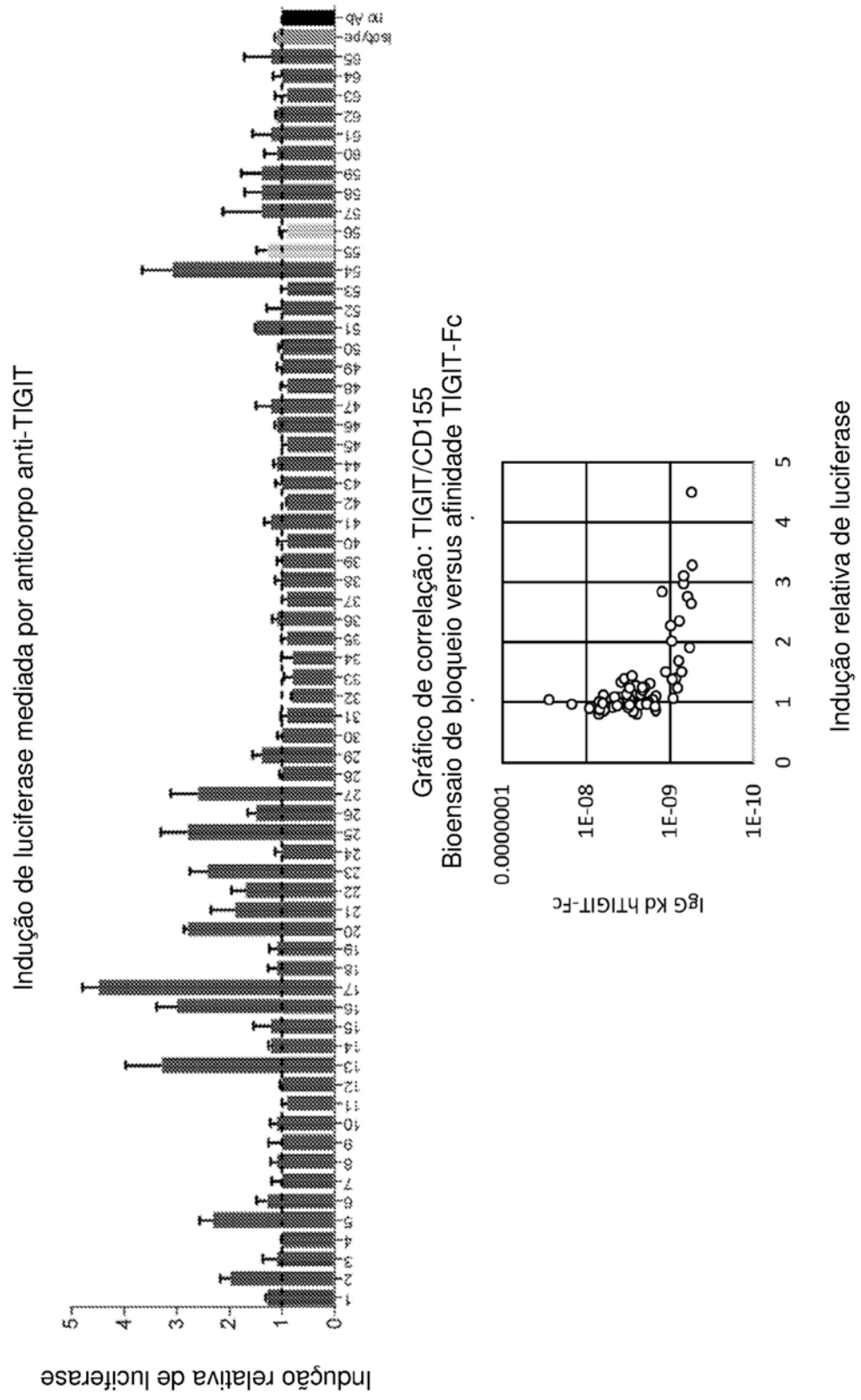

Bloqueio percentual
120
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
Log[Ab] ug/mL
hIgG1 iso
c55
c25
c5
c2
c13
c17

Figura 6

Figura 7A


Indução de luciferase mediada por anticorpo anti-TIGIT
Indução relativa de luciferase
Gráfico de correlação: TIGIT/CD155
Bioensaio de bloqueio versus afinidade TIGIT-Fc
IgG Kd hTIGIT-Fc
0.0000001
1E-08
1E-09
1E-10
0
1
2
3
4
5
Indução relativa de luciferase

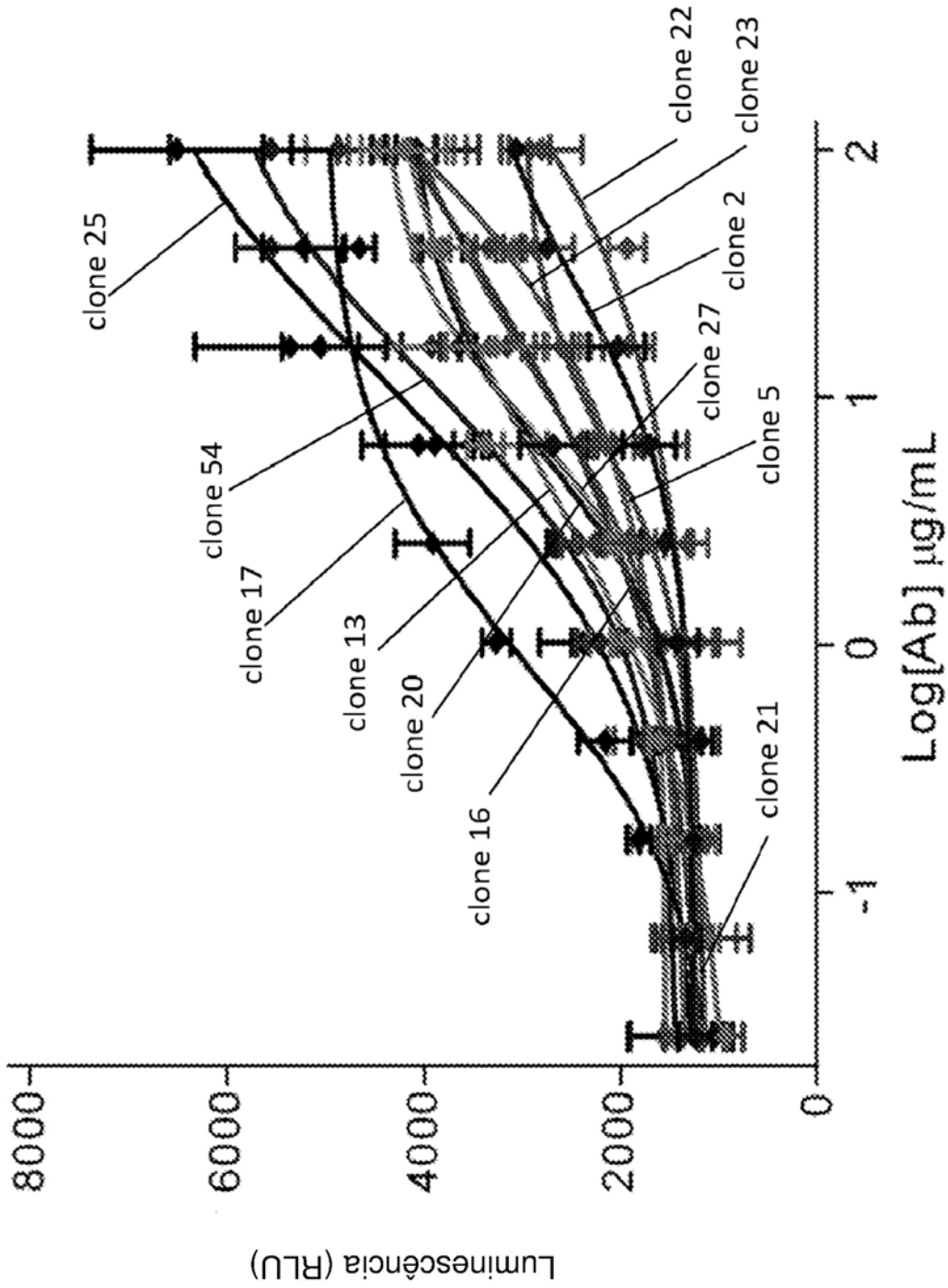

Luminescência (RLU)
8000
6000
4000
2000
0
-1
0
1
2
Log[Ab] µg/mL
clone 25
clone 54
clone 17
clone 13
clone 20
clone 16
clone 21
clone 5
clone 27
clone 2
clone 23
clone 22

Figura 7B

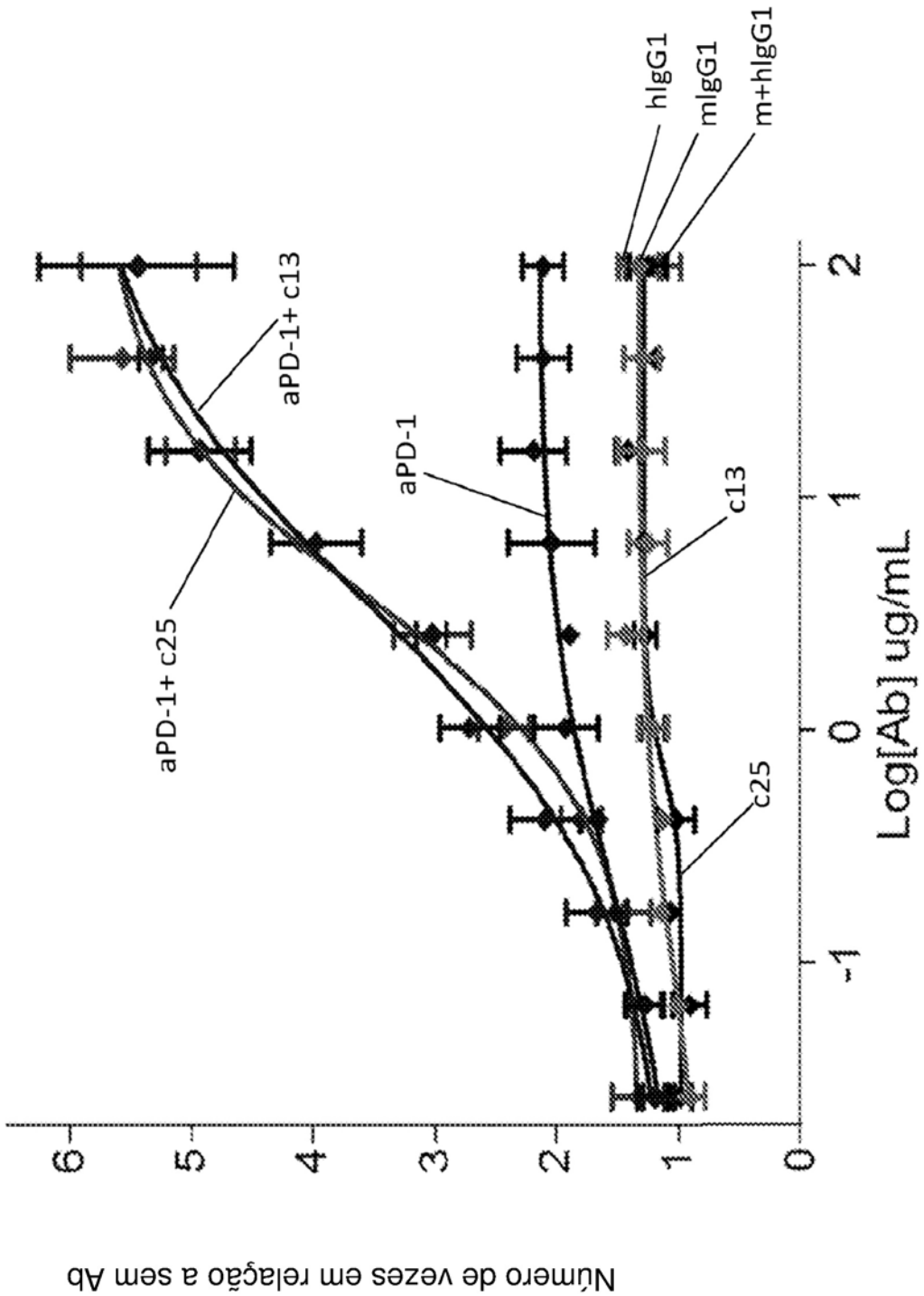

Número de vezes em relação a sem Ab
0
1
2
3
4
5
6
-1
0
1
2
Log[Ab] ug/mL
aPD-1+ c25
aPD-1+ c13
aPD-1
c13
c25
hIgG1
mIgG1
m+hIgG1

Figura 8

Figura 9A

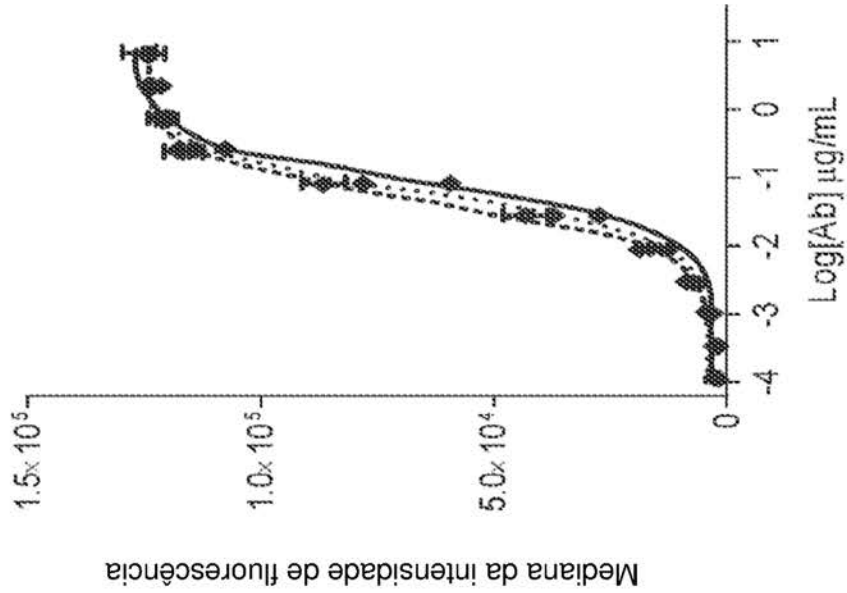
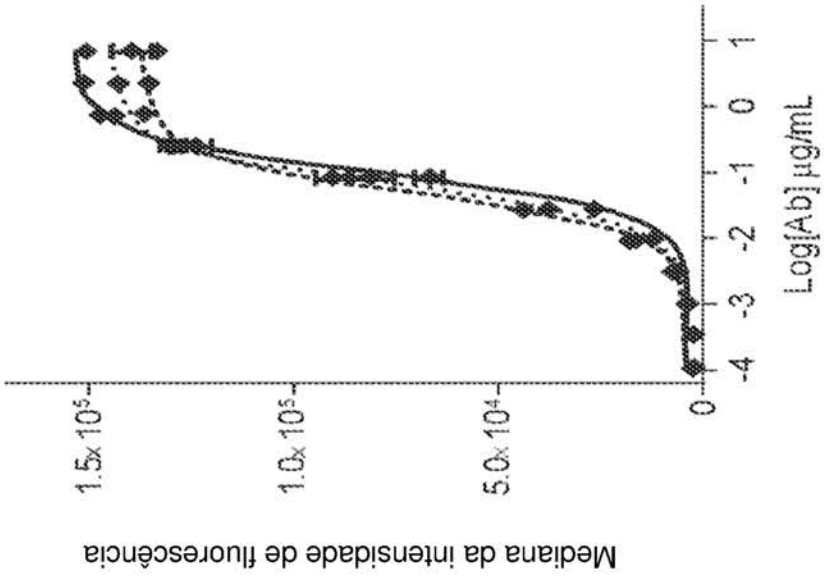


Figura 9B



Petição 870210016809, de 19/02/2021, pág. 296/350

Figura 9C

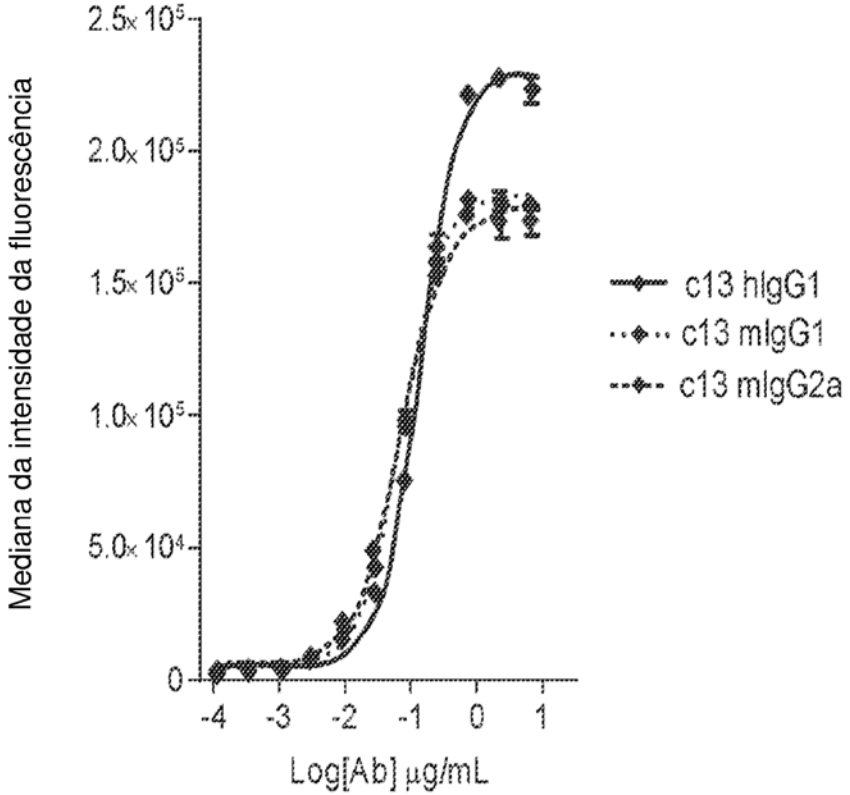


Figura 9D

EC50s (µg/mL)

	c13 HIgG1	c13 mIgG1	c13 mIgG2a
Humano	0,09	0,05	0,04
Camundongo	0,10	0,06	0,05
Cyno	0,13	0,07	0,07

Figura 9E

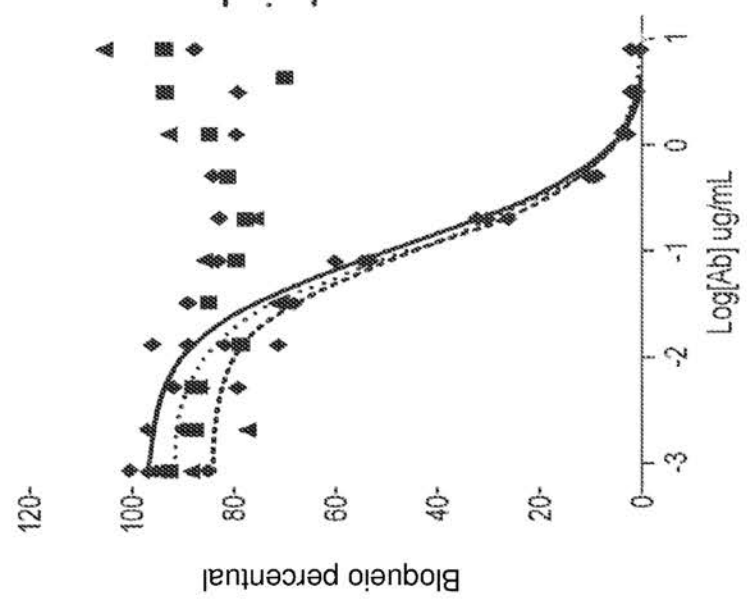
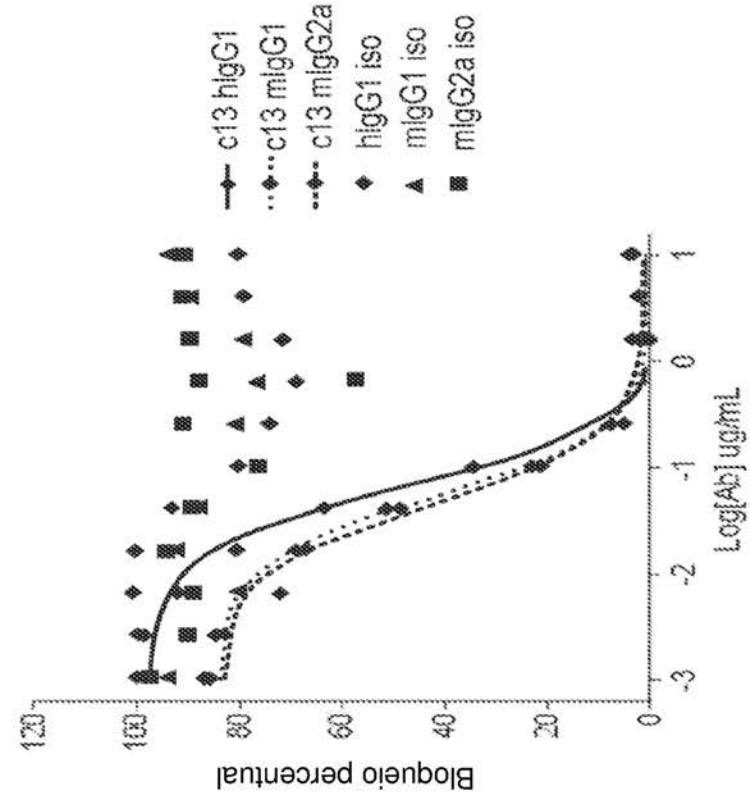


Figura 9F



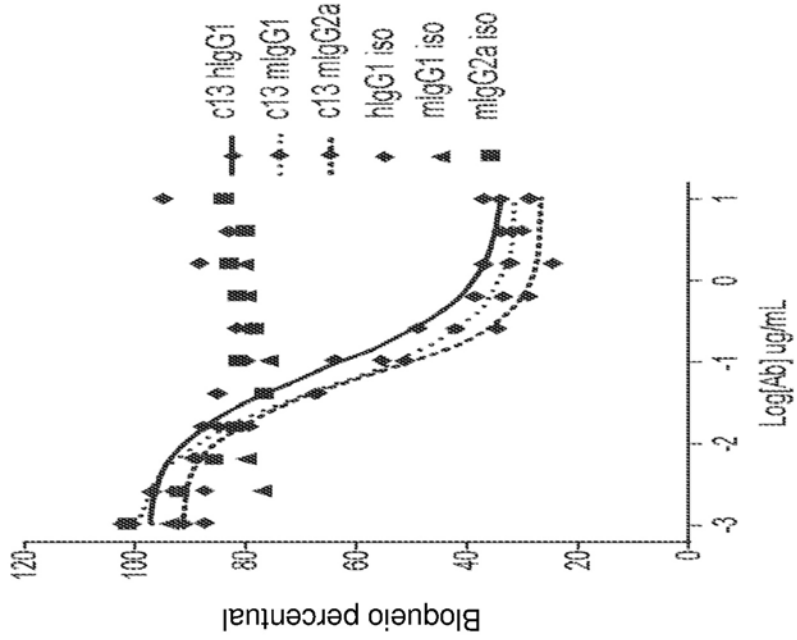

Bloqueio percentual
120
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
Log[Ab] ug/mL
c13 hIgG1
c13 mIgG1
c13 mIgG2a
hIgG1 iso
mIgG1 iso
mIgG2a iso

Figura 9G

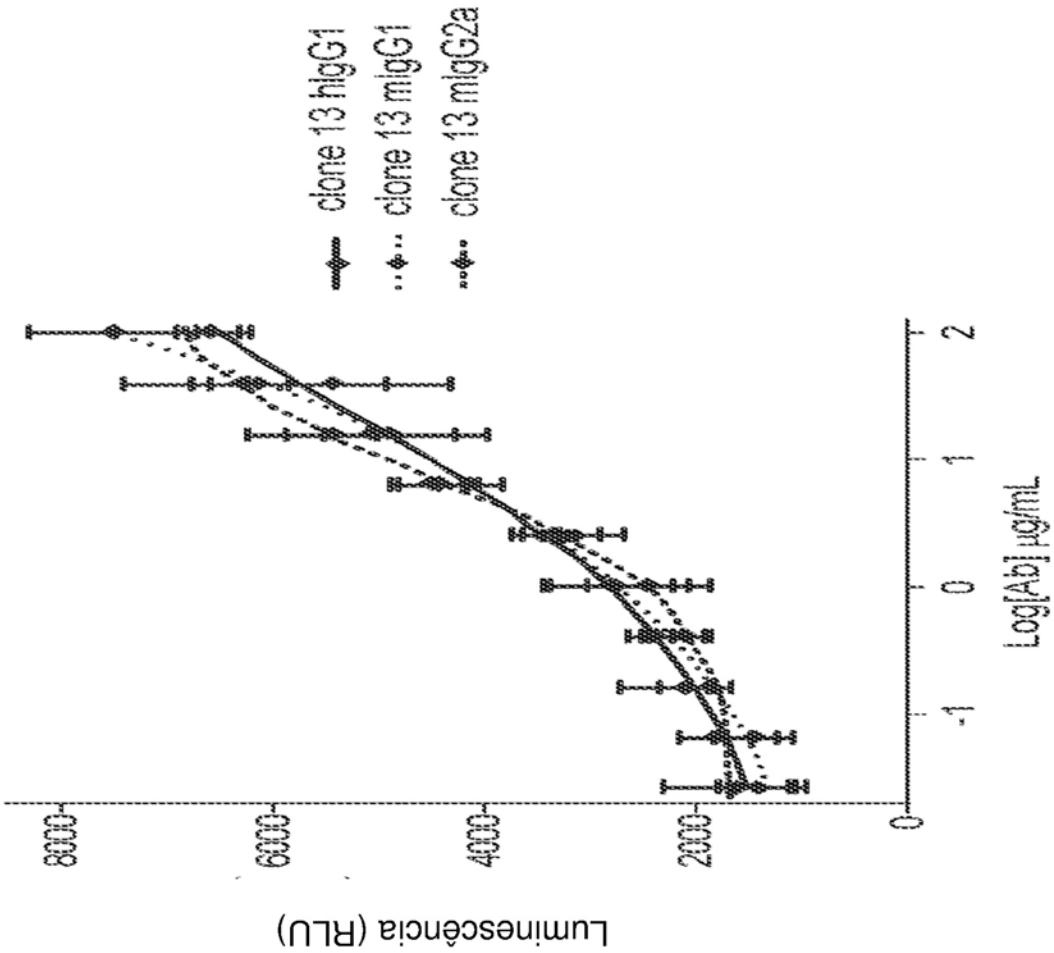
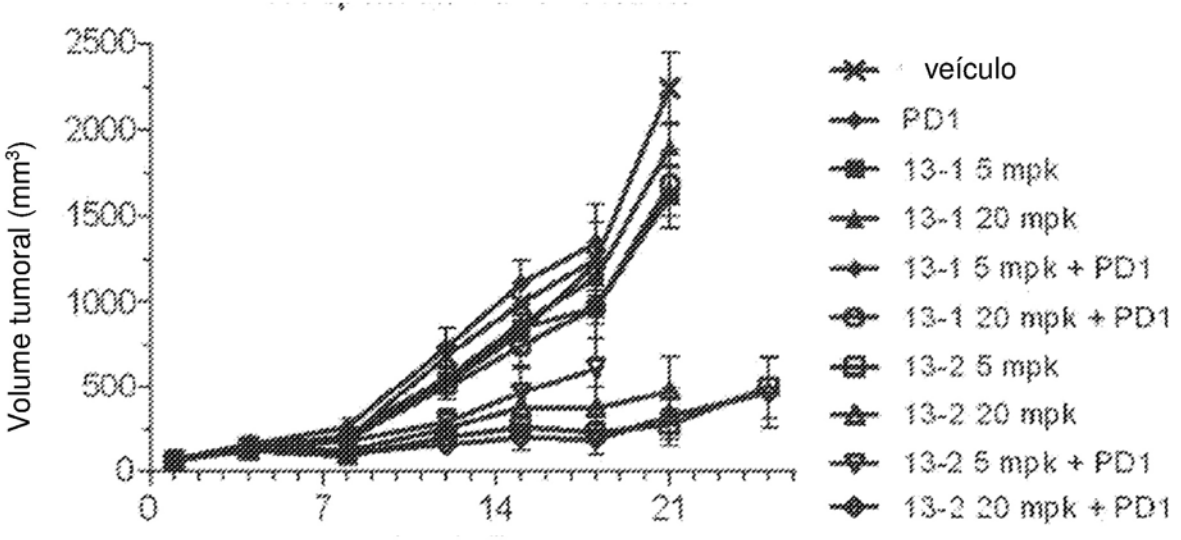

clone 13 hIgG1
clone 13 mIgG1
clone 13 mIgG2a
Luminescência (RLU)
8000
6000
4000
2000
0
-1
0
1
2
Log[Ab] µg/mL

Figura 9H

Petição 870210016809, de 19/02/2021, pág. 300/350

Figura 10A

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volume tumoral médio dos grupos



Camundongos Balb/c fêmeas
CT26 (3E+05 células/camundongo) inoculação s.c. 28-Out-2016
aTIGIT: 2xsem. x 3 dose IP a partir do Dia 1
13-1 = quimera mIgG1 do clone 13
13-2 = quimera mIgG2a do clone 13
aPD-1: 2x/sem. x 2 dose IP a partir do Dia 1
Dia 1 do estudo = Dia 7 após inoculação do tumor
Estudo no CT26-e323 do Charles River Laboratories

Média +/- SEM do grupo
n = 10/grupo

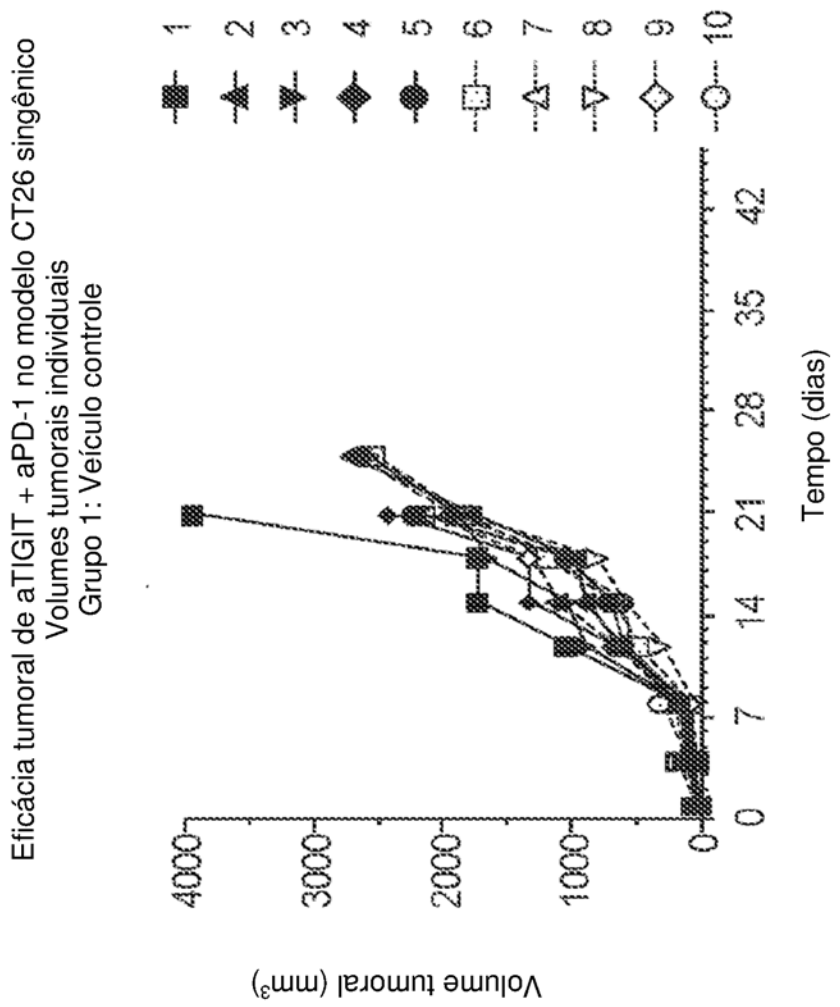

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 1: Veículo controle
Volume tumoral (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Figura 10B

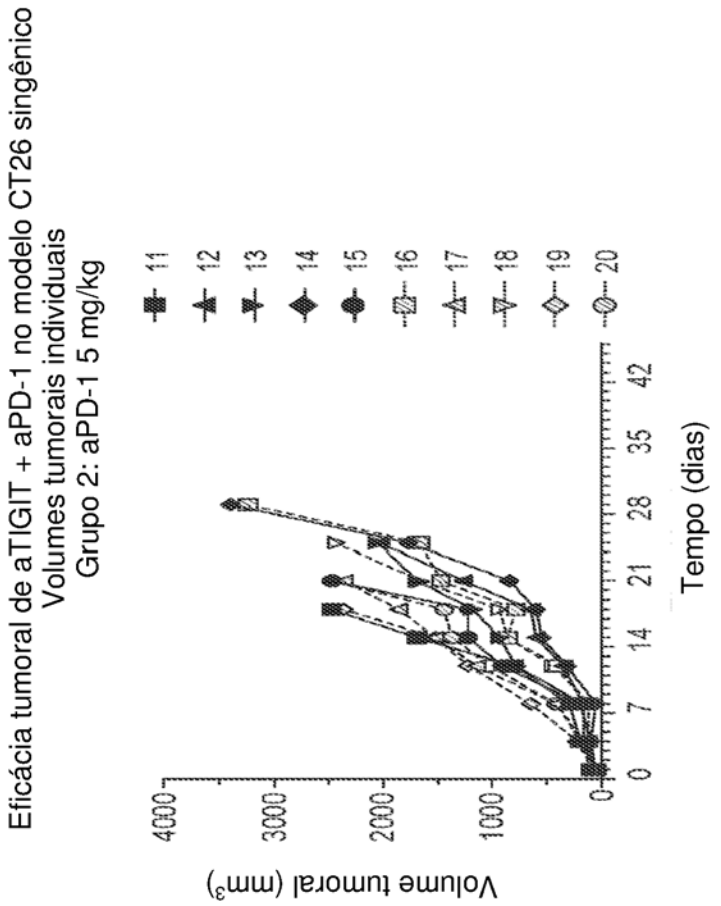

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 2: aPD-1 5 mg/kg
Volume tumoral (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Figura 10C

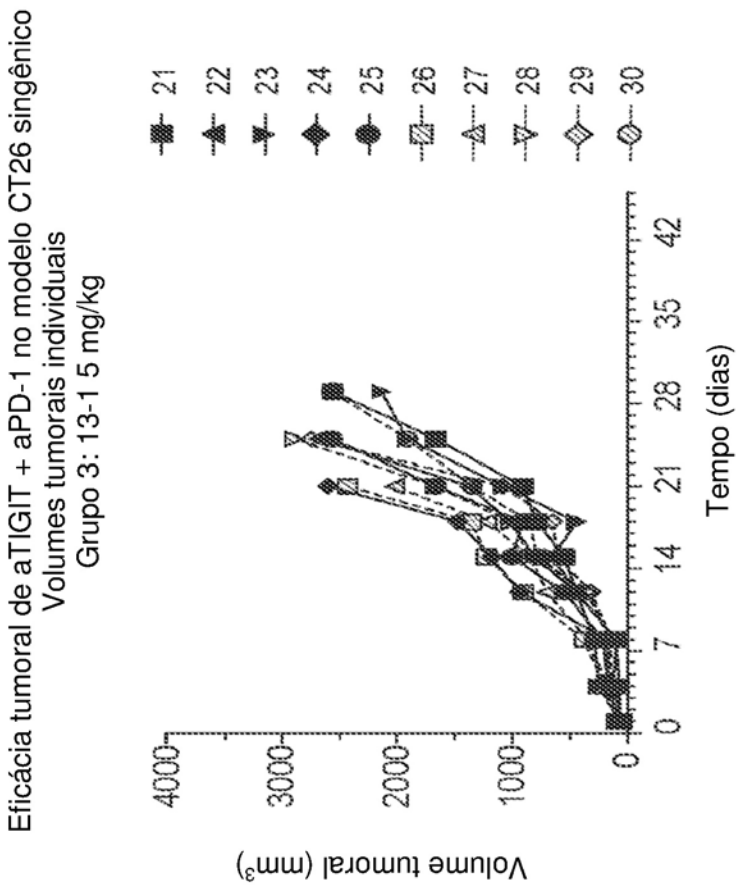

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 3: 13-1 5 mg/kg
Volume tumoral (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Figura 10D

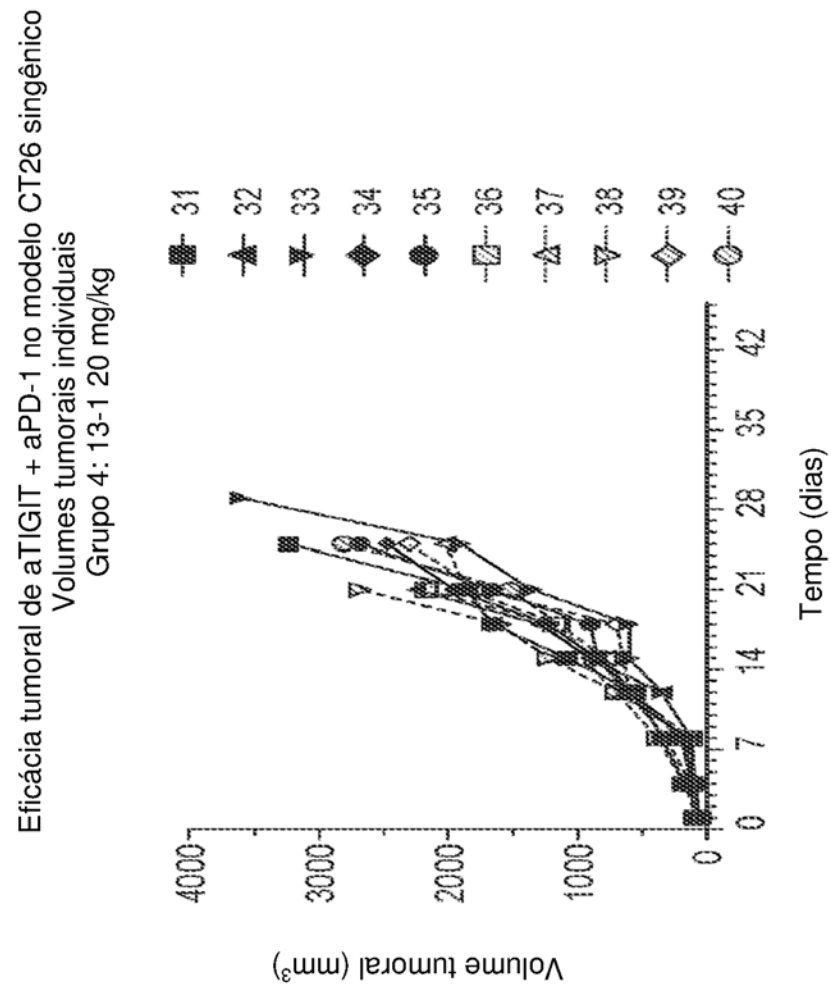

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 4: 13-1 20 mg/kg
Volume tumoral (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

Figura 10E

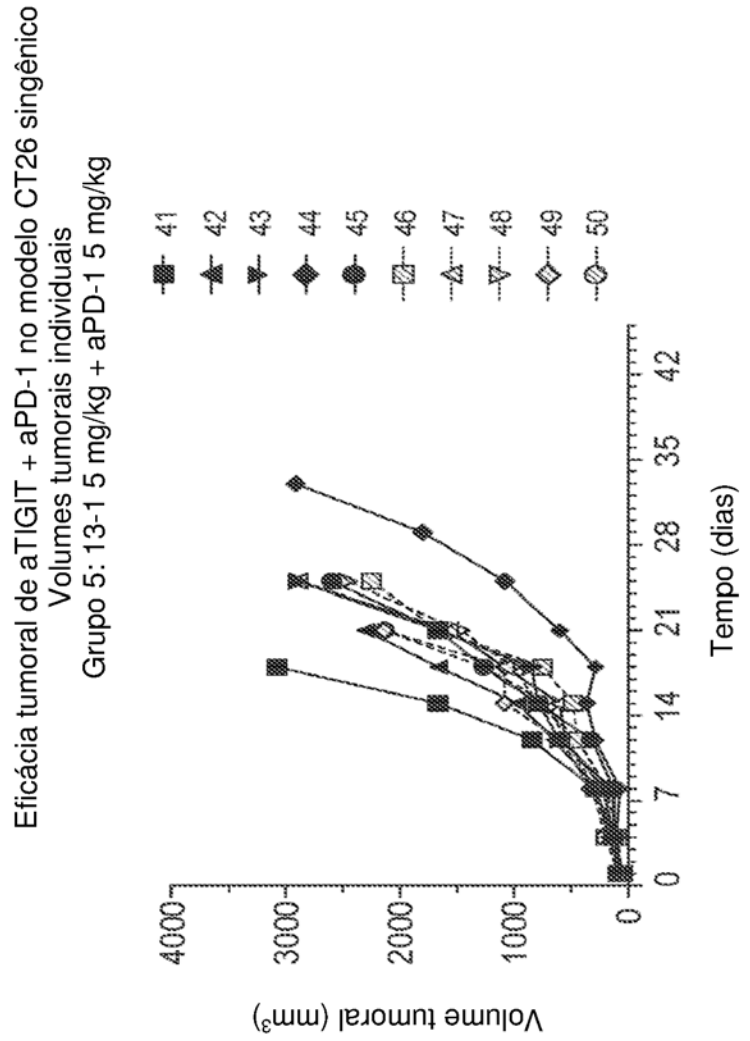

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 5: 13-1 5 mg/kg + aPD-1 5 mg/kg
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
Volume tumoral (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)

Figura 10F

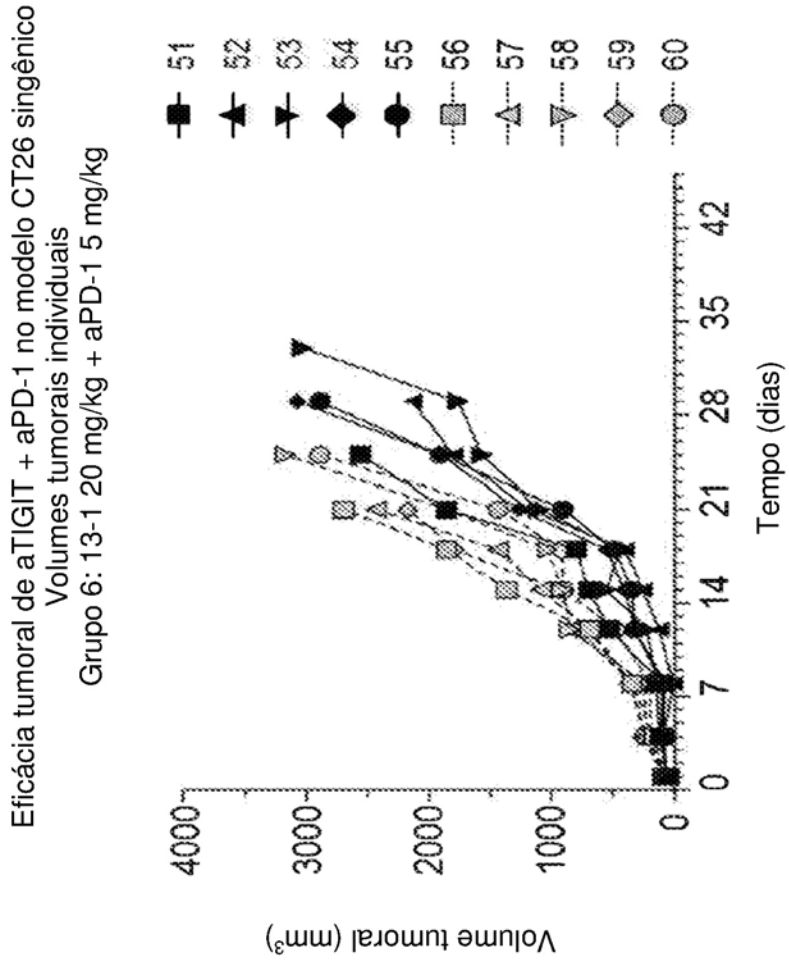

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 6: 13-1 20 mg/kg + aPD-1 5 mg/kg
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
4000
3000
2000
1000
0
Volume tumoral (mm³)
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)

Figura 10G

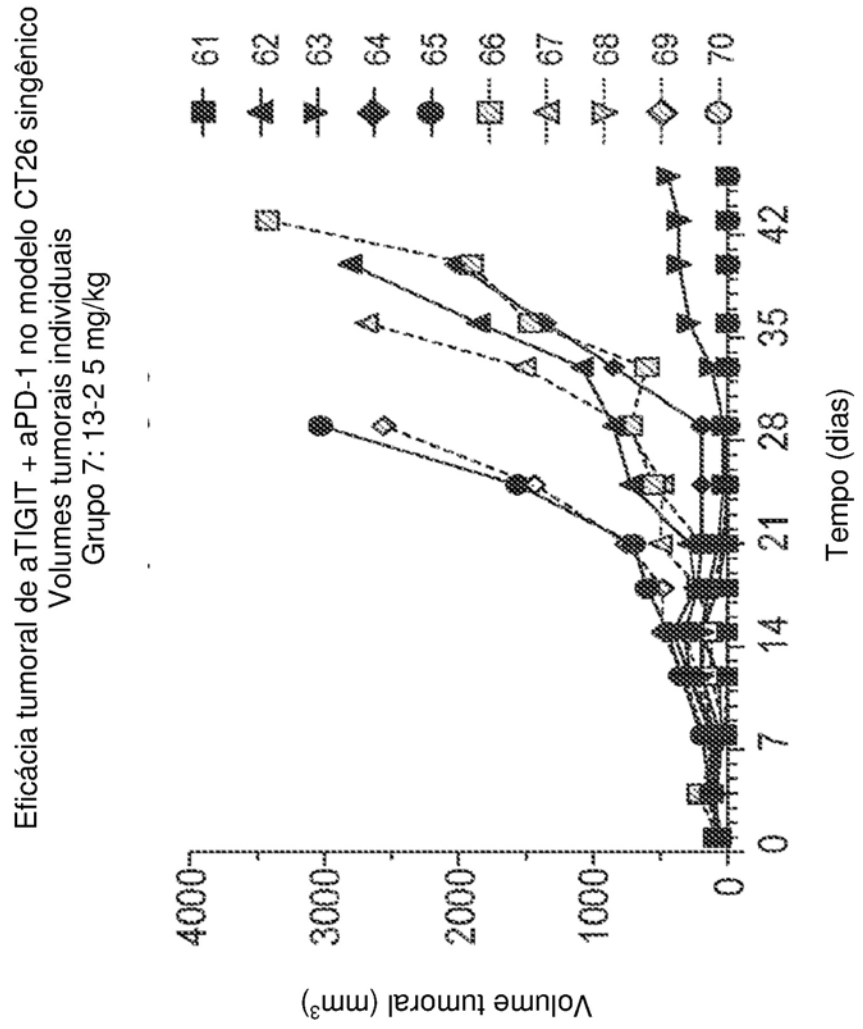

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 7: 13-2 5 mg/kg
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
4000
3000
2000
1000
0
Volume tumoral (mm³)
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)

Figura 10H

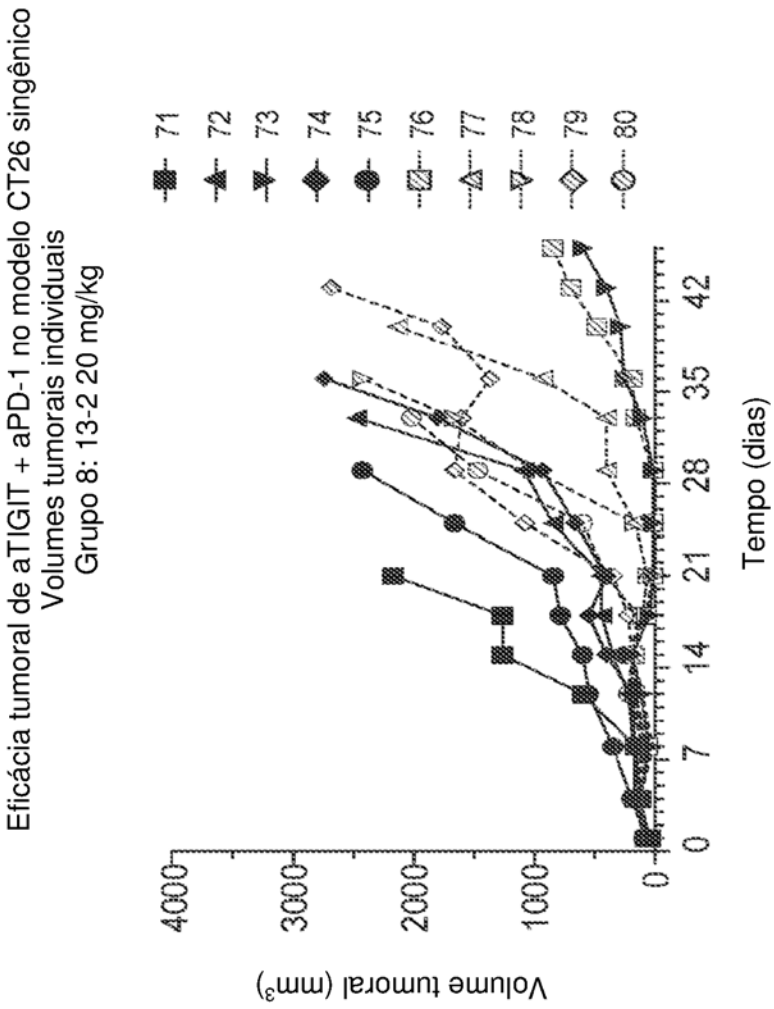

Eficácia tumoral de aTIGIT + aPD-1 no modelo CT26 singênico
Volumes tumorais individuais
Grupo 8: 13-2 20 mg/kg
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
4000
3000
2000
1000
0
Volume tumoral (mm³)
0
7
14
21
28
35
42
Tempo (dias)

Figura 10I

Figura 10J

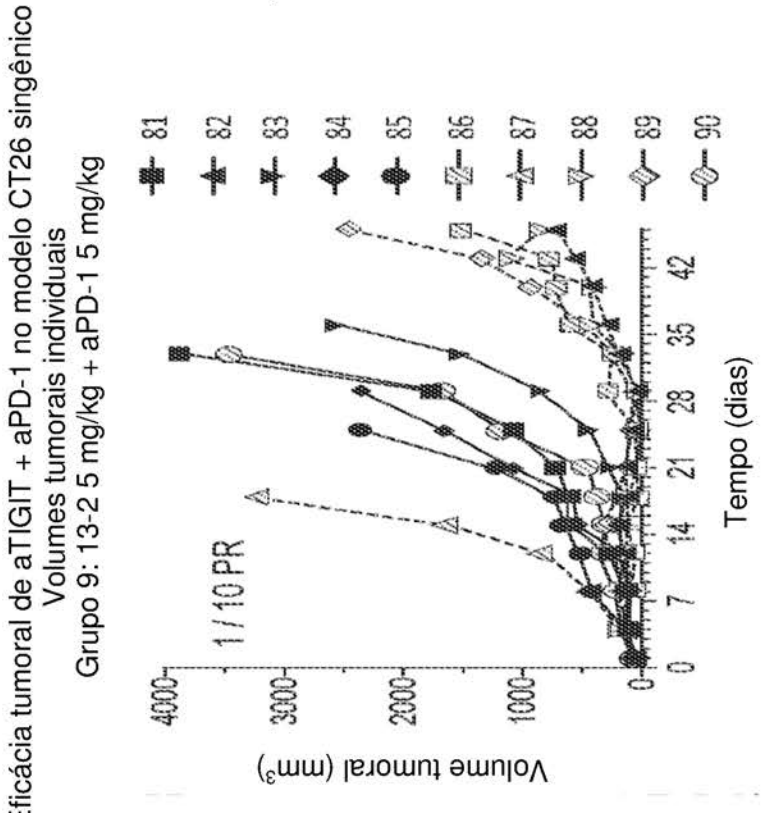


Figura 10K

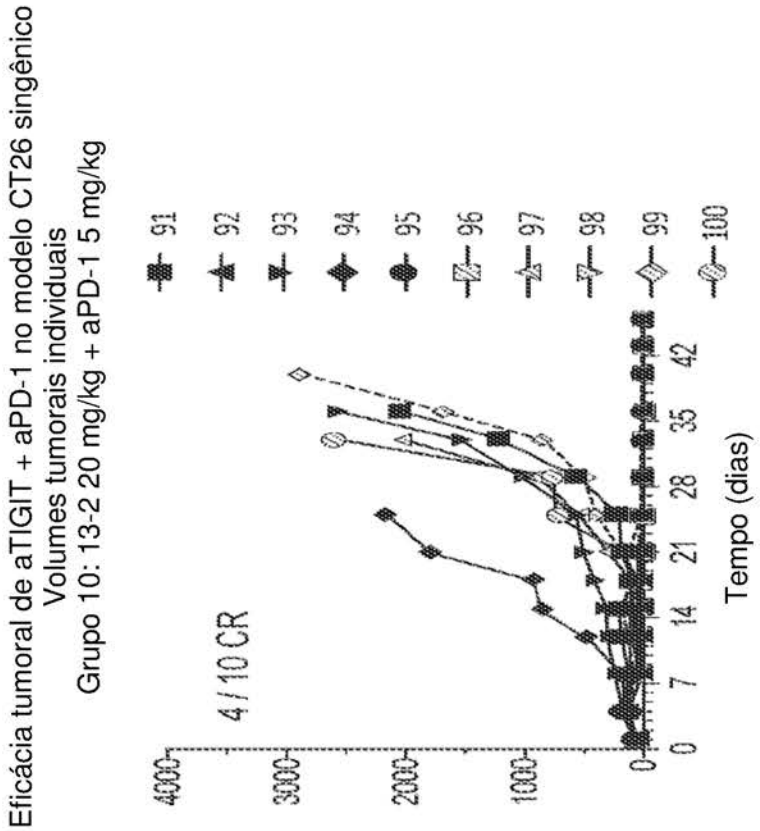


Figura 11

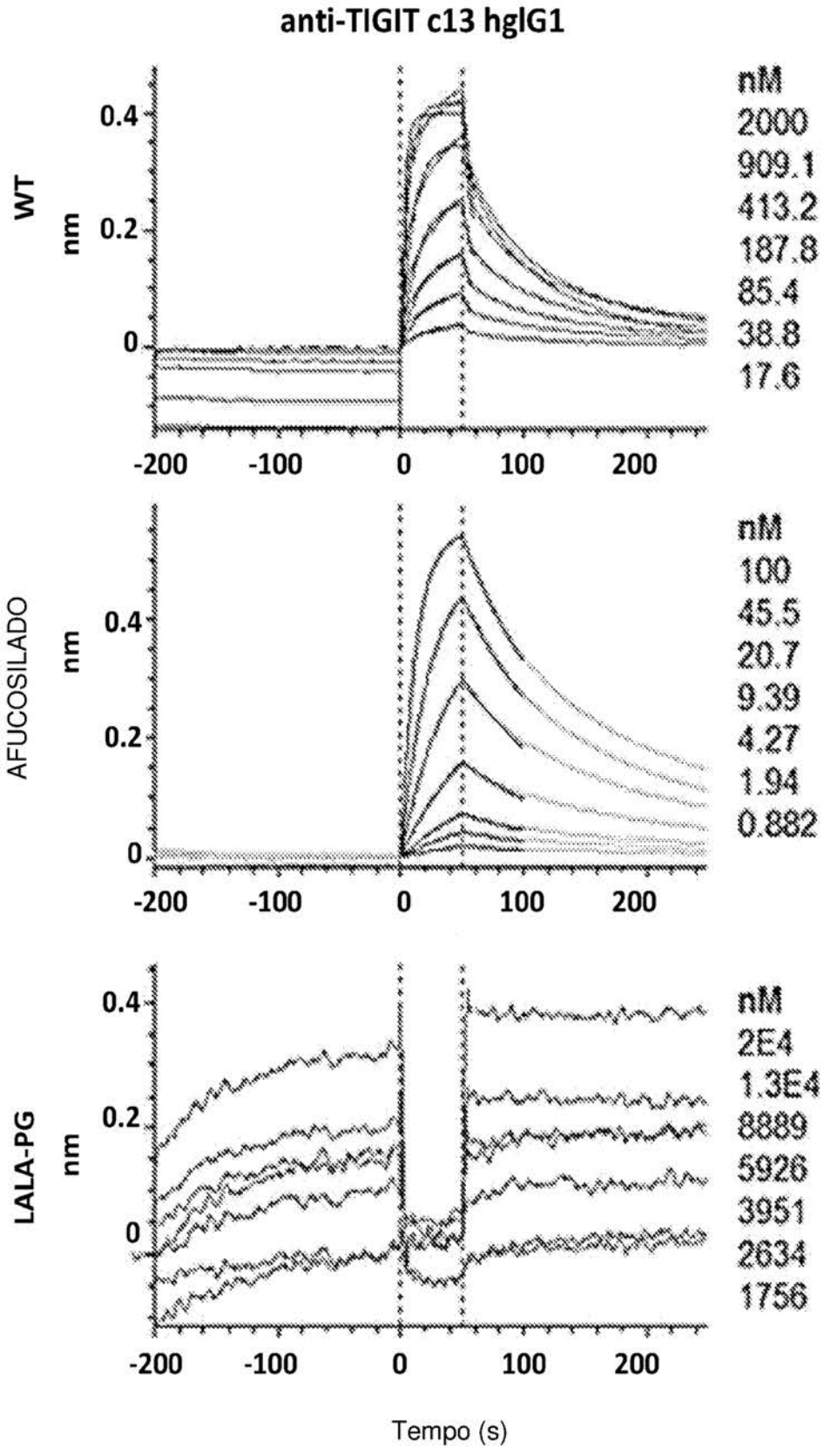

anti-TIGIT c13 hgIG1
WT
nm
0.4
0.2
0
-200
-100
0
100
200
nM
2000
909.1
413.2
187.8
85.4
38.8
17.6
AFUCOSILADO
nm
0.4
0.2
0
-200
-100
0
100
200
nM
100
45.5
20.7
9.39
4.27
1.94
0.882
LALA-PG
nm
0.4
0.2
0
-200
-100
0
100
200
nM
2E4
1.3E4
8889
5926
3951
2634
1756
Tempo (s)

Figura 11 (continuação)

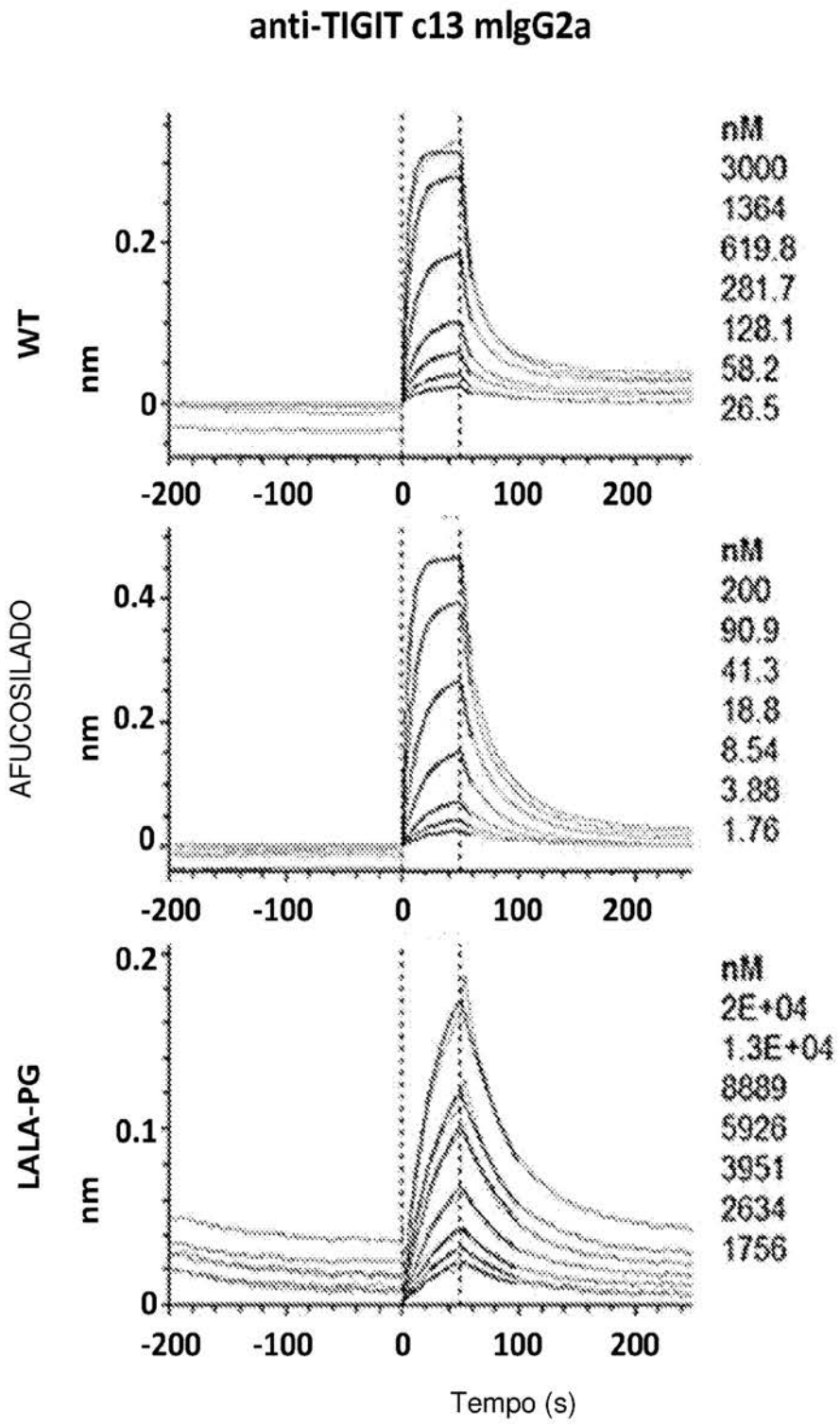


Figura 11 (continuação)

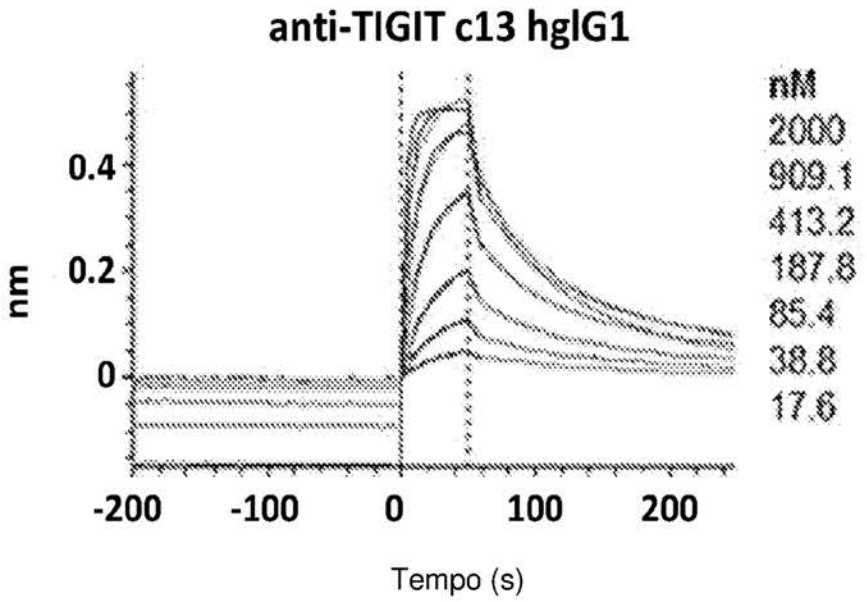
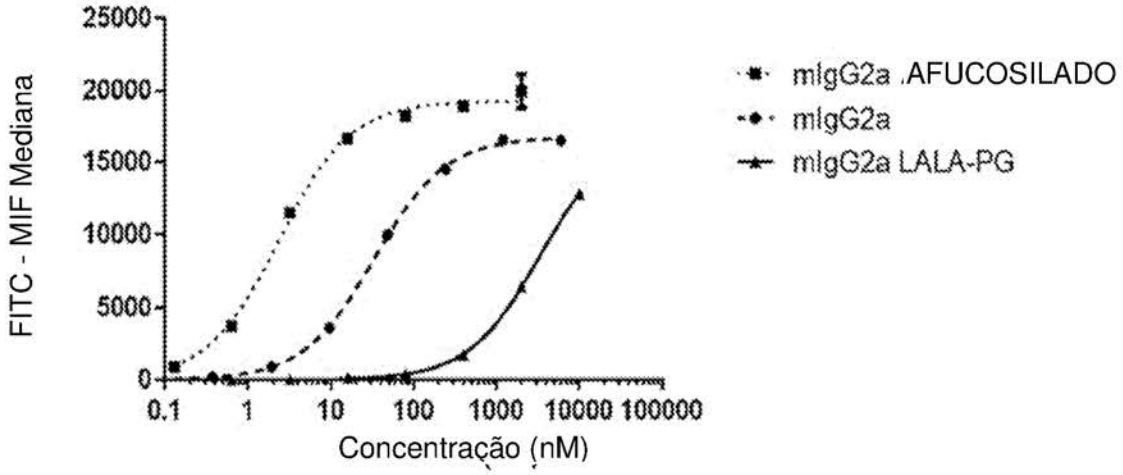


Figura 12



	mIgG2a	mIgG2a afucos.	mIgG2a LALA-PG
KD (nM)	33,4	2,37	3330
KD Erro padrão	1,1	0,21	120
B máx.	16720	19270	17045

Figura 13

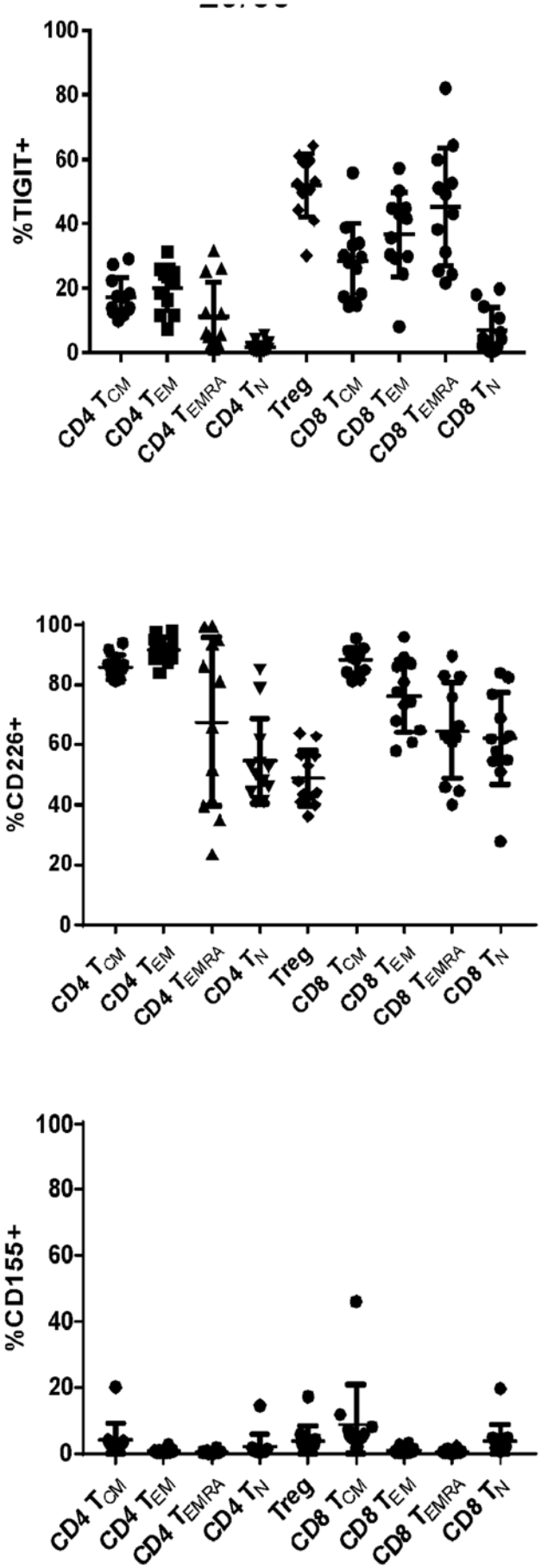

%TIGIT+
%CD226+
%CD155+
100
80
60
40
20
0
CD4 TCM
CD4 TEM
CD4 TEMRA
CD4 TN
Treg
CD8 TCM
CD8 TEM
CD8 TEMRA
CD8 TN

Figura 14

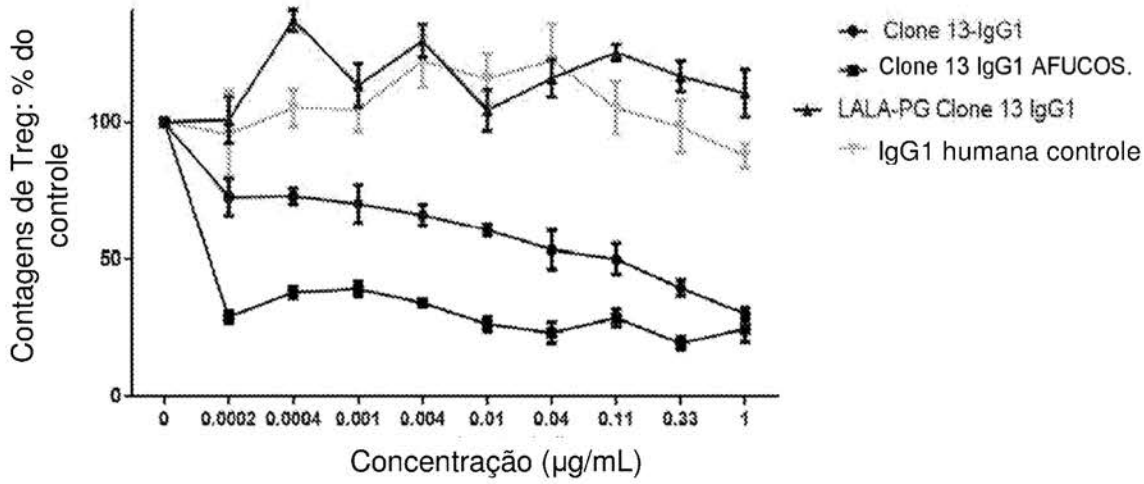


Figura 15

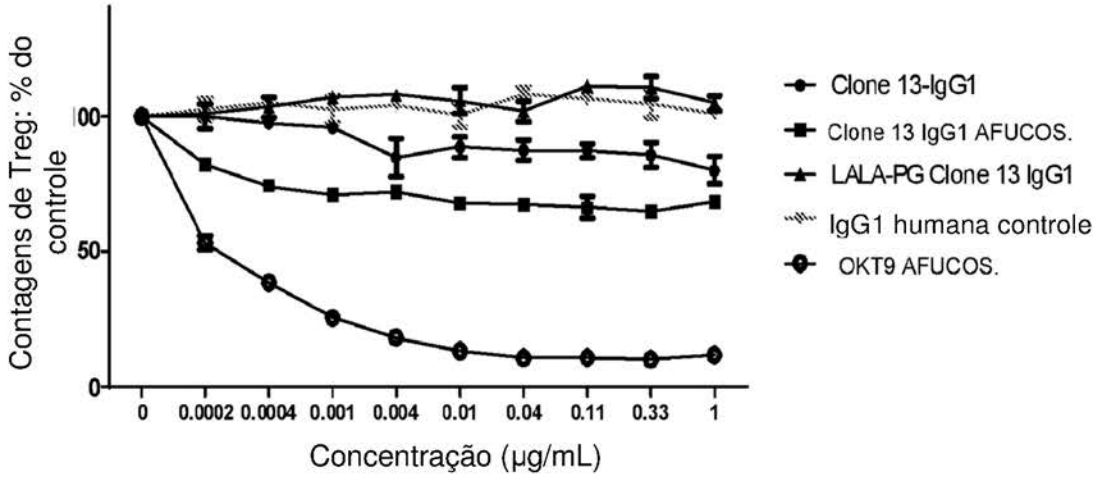
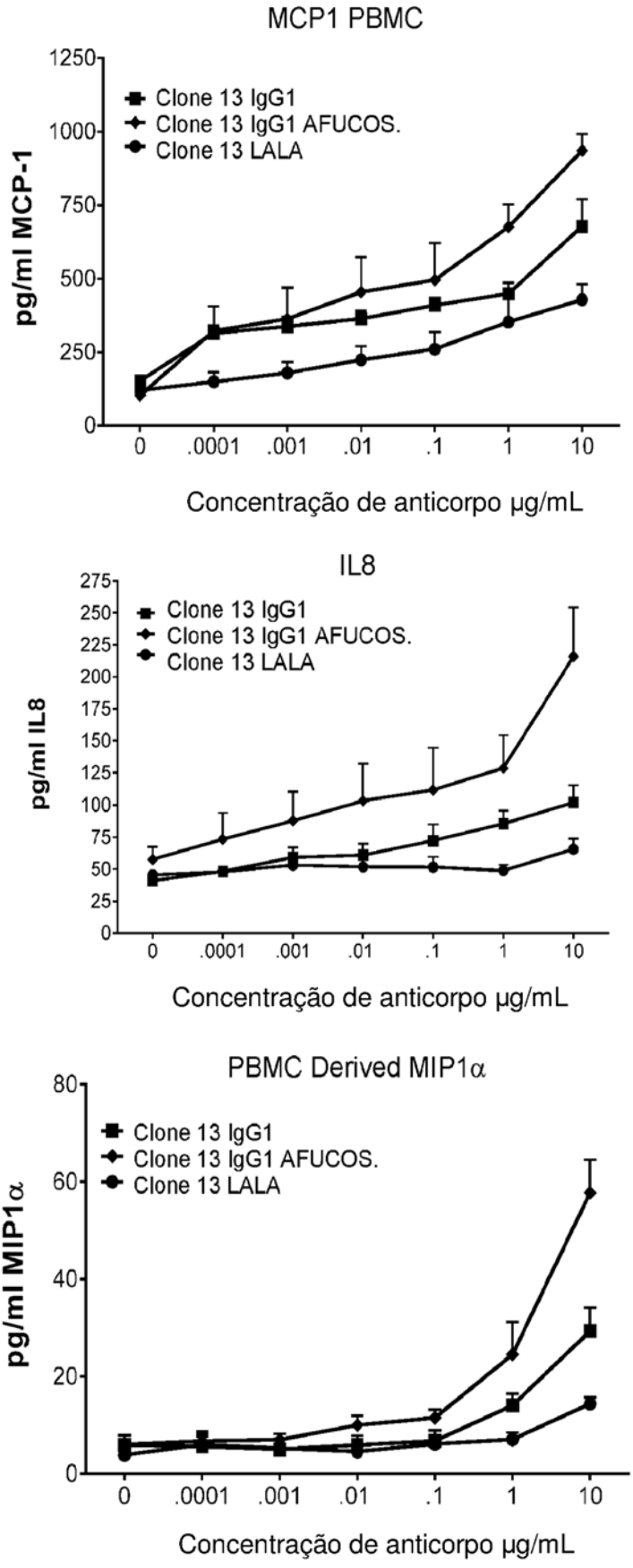


Figura 16


MCP1 PBMC
pg/ml MCP-1
1250
1000
750
500
250
0
Clone 13 IgG1
Clone 13 IgG1 AFUCOS.
Clone 13 LALA
0
.0001
.001
.01
.1
1
10
Concentração de anticorpo µg/mL
IL8
pg/ml IL8
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
Clone 13 IgG1
Clone 13 IgG1 AFUCOS.
Clone 13 LALA
0
.0001
.001
.01
.1
1
10
Concentração de anticorpo µg/mL
PBMC Derived MIP1α
pg/ml MIP1α
80
60
40
20
0
Clone 13 IgG1
Clone 13 IgG1 AFUCOS.
Clone 13 LALA
0
.0001
.001
.01
.1
1
10
Concentração de anticorpo µg/mL

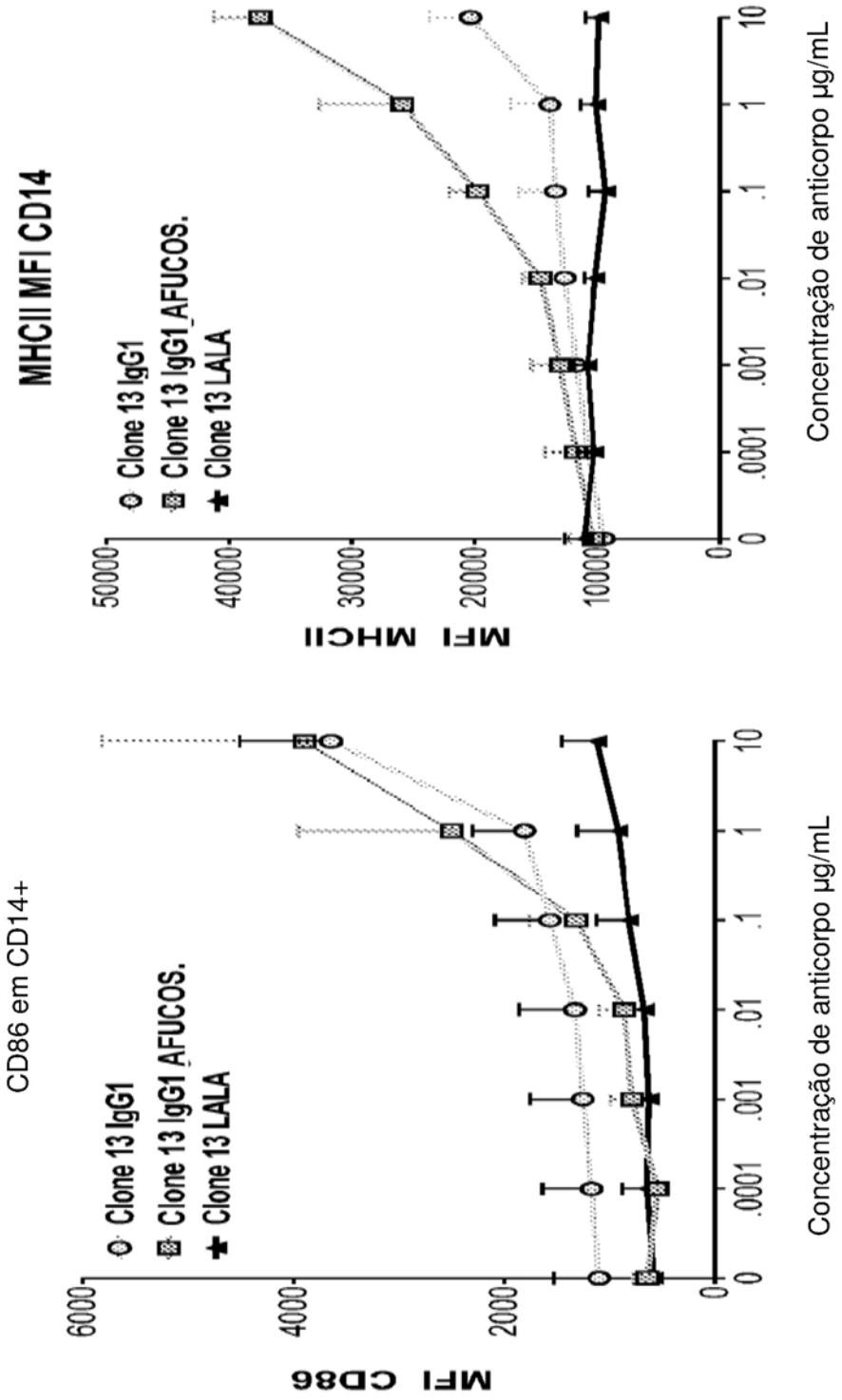

MHCII MFI CD14
Clone 13 IgG1
Clone 13 IgG1_AFUCOS.
Clone 13 LALA
MFI MHCII
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
.0001
.001
.01
.1
1
10
Concentração de anticorpo µg/mL
CD86 em CD14+
Clone 13 IgG1
Clone 13 IgG1 AFUCOS.
Clone 13 LALA
MFI CD86
6000
4000
2000
0
0
.0001
.001
.01
.1
1
10
Concentração de anticorpo µg/mL

Figura 17

Figura 18A

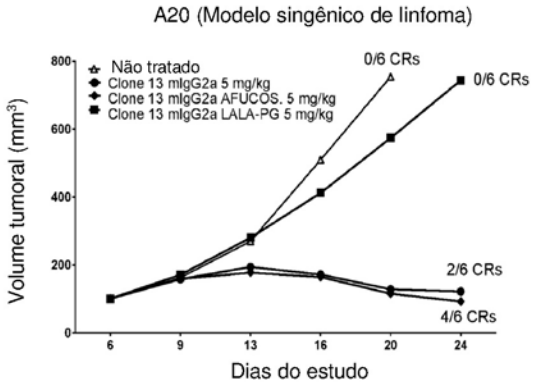


Figura 18B

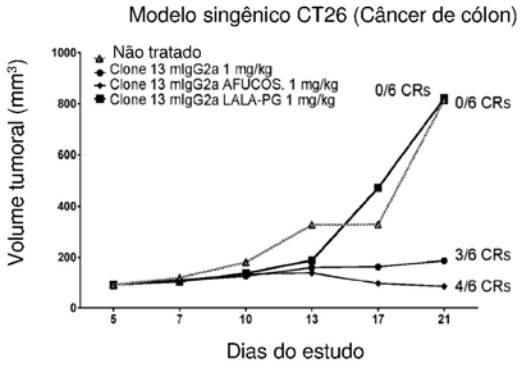


Figura 18C

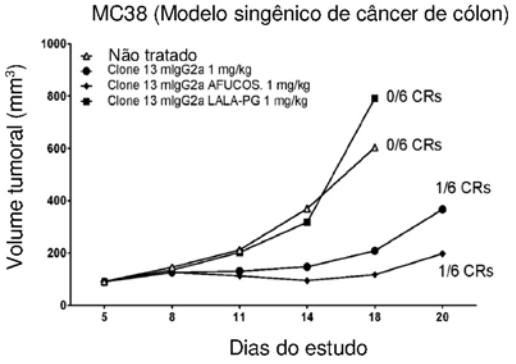


Figura 19

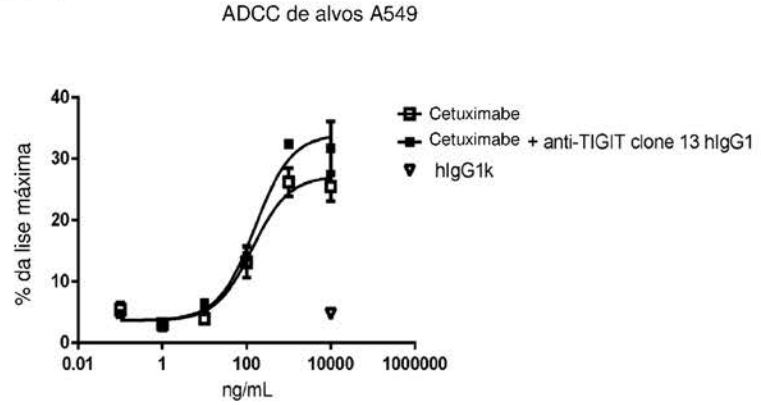


Figura 20

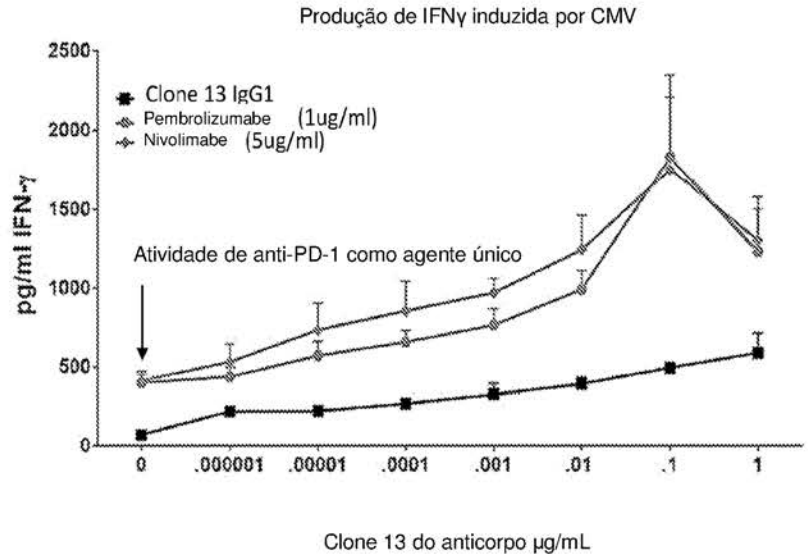


Figura 21

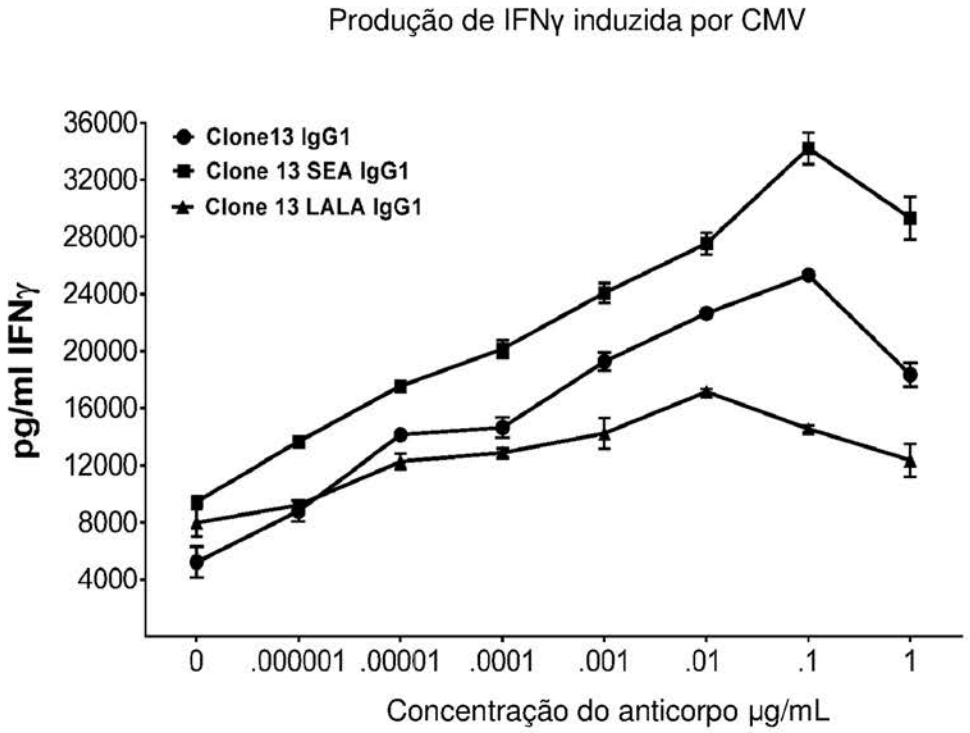


Figura 22

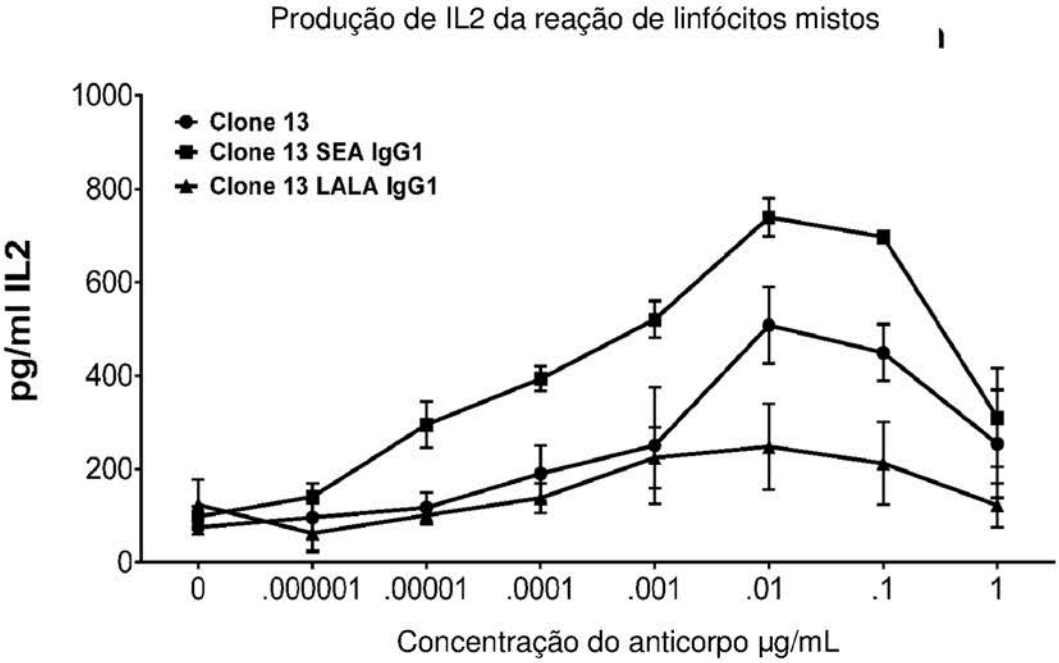


Figura 23

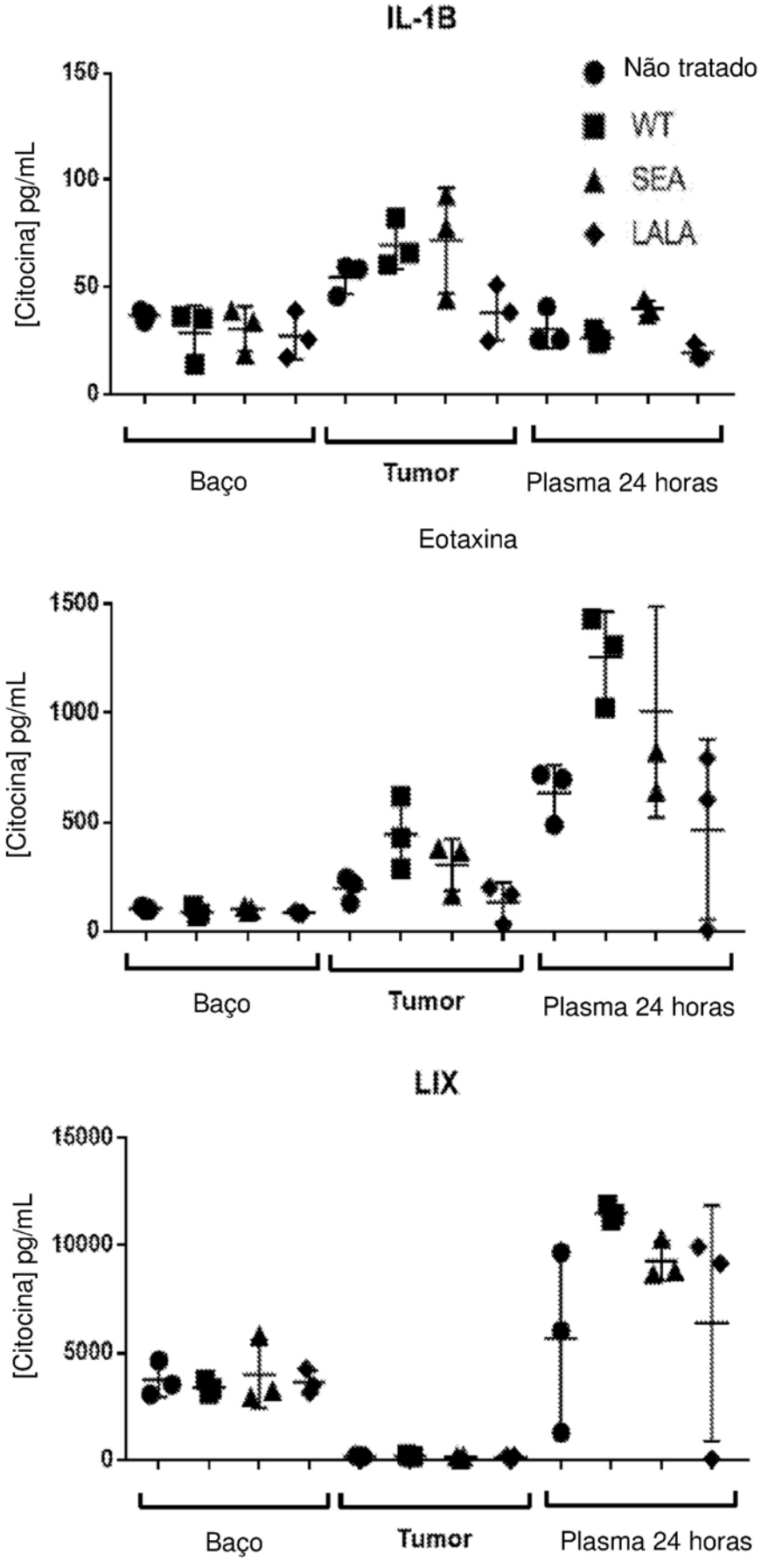

IL-1B
Não tratado
WT
SEA
LALA
[Citocina] pg/mL
150
100
50
0
Baço
Tumor
Plasma 24 horas
Eotaxina
[Citocina] pg/mL
1500
1000
500
0
Baço
Tumor
Plasma 24 horas
LIX
[Citocina] pg/mL
15000
10000
5000
0
Baço
Tumor
Plasma 24 horas

Figura 23 (continuação)

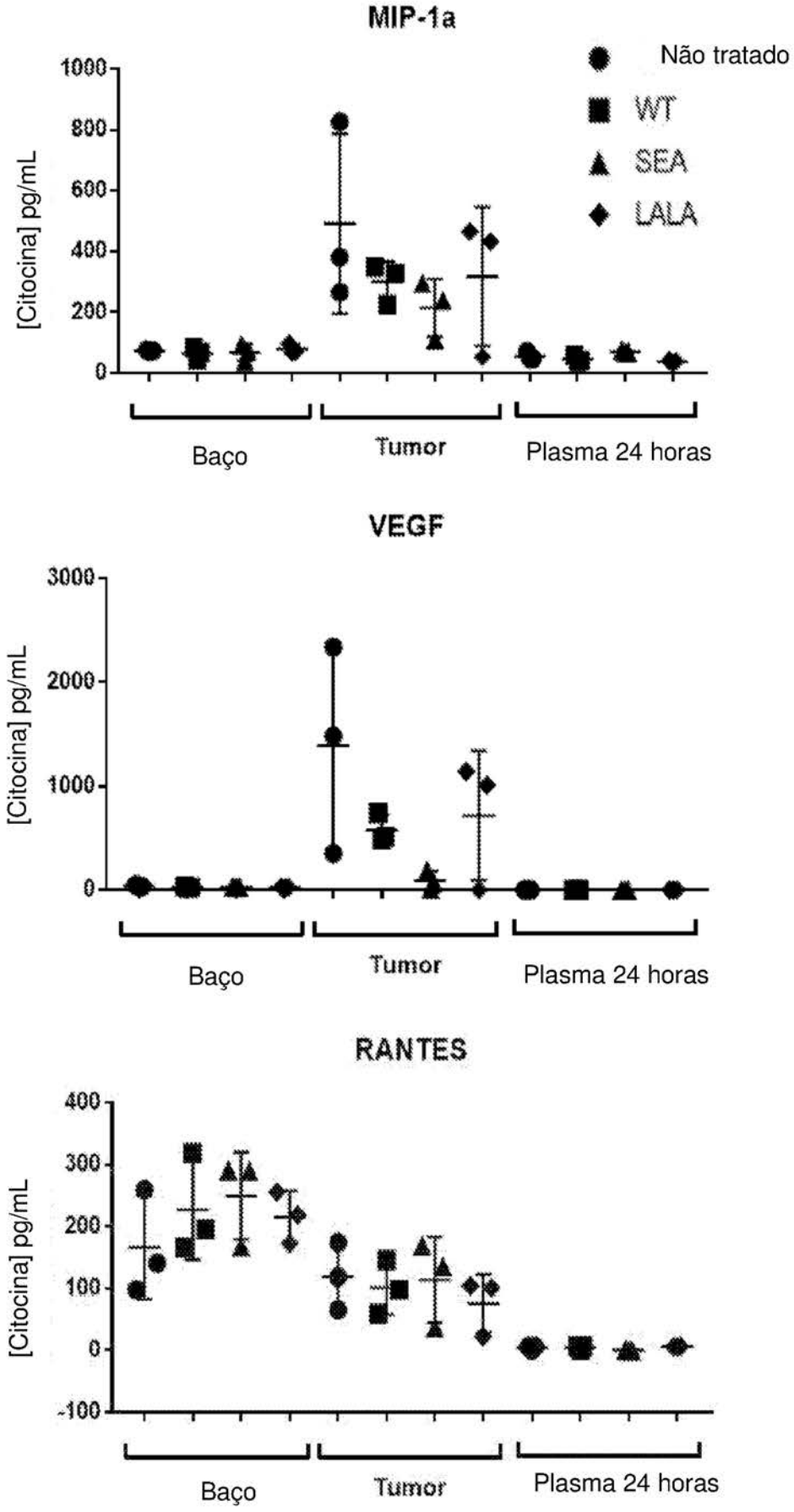


Figura 24

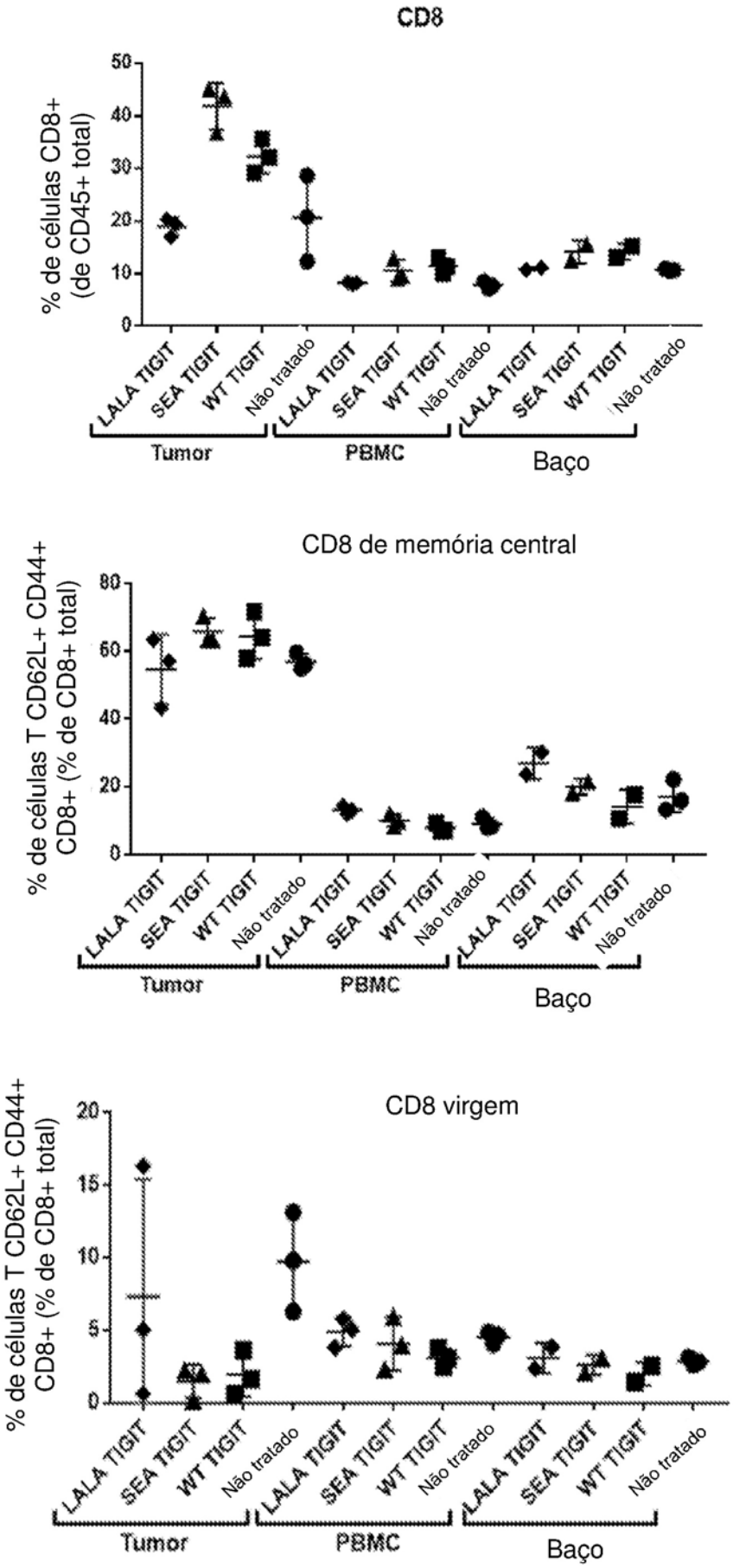
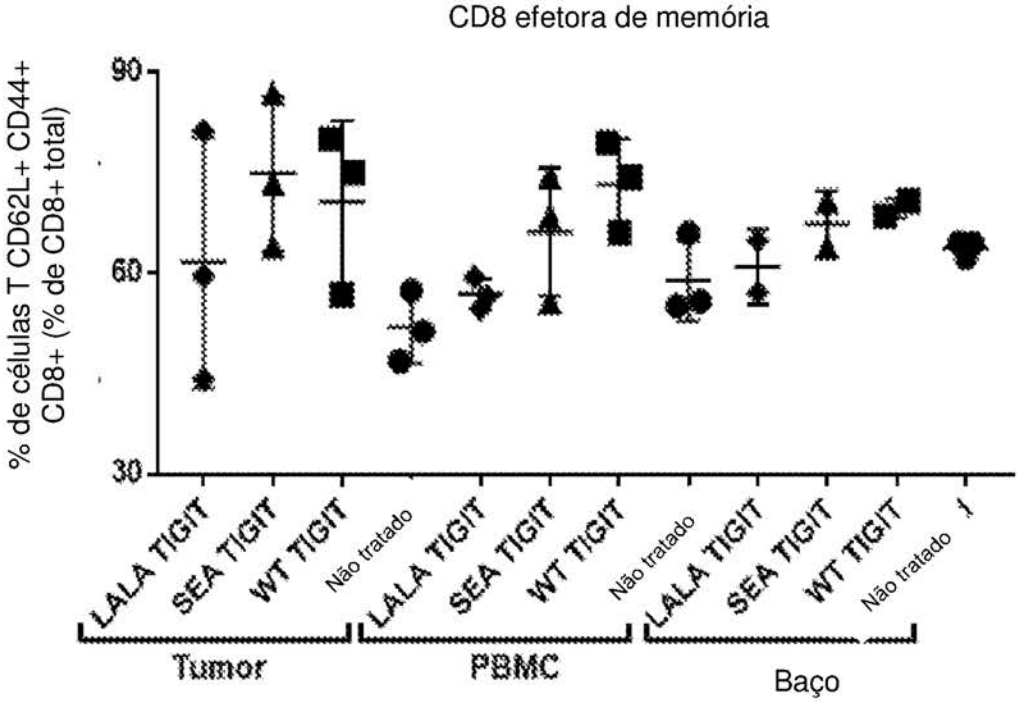

CD8
% de células CD8+ (de CD45+ total)
50
40
30
20
10
0
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado
Tumor
PBMC
Baço
CD8 de memória central
% de células T CD62L+ CD44+ CD8+ (% de CD8+ total)
80
60
40
20
0
CD8 virgem
% de células T CD62L+ CD44+ CD8+ (% de CD8+ total)
20
15
10
5
0

Figura 24 (continuação)



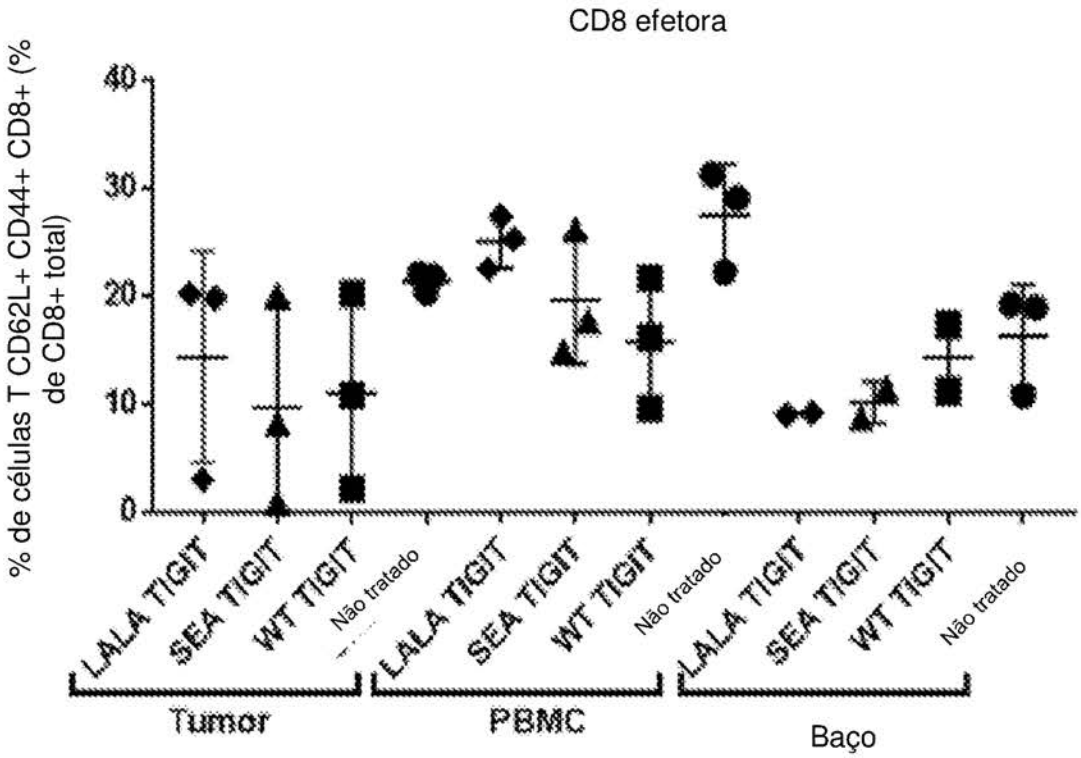


Figura 25

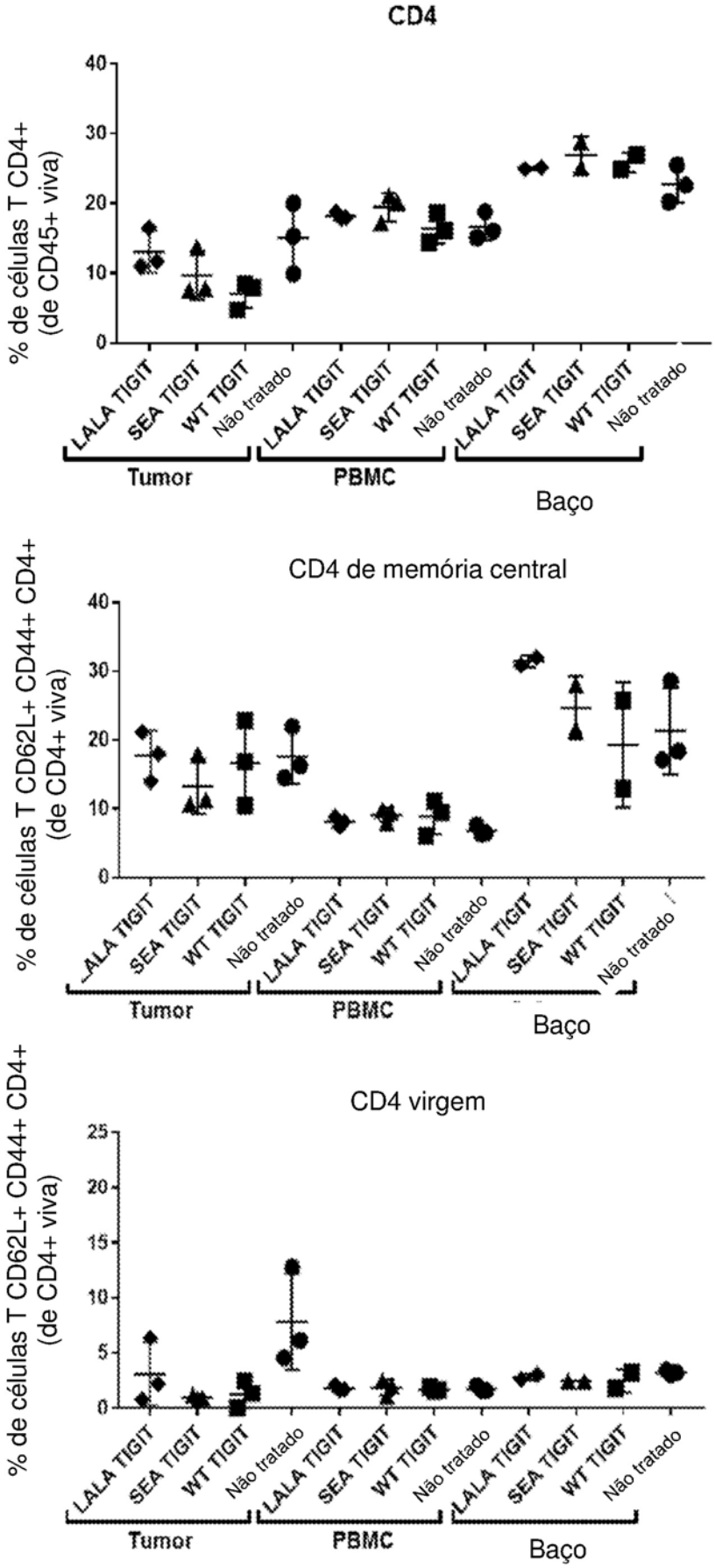

CD4
% de células T CD4+ (de CD45+ viva)
40
30
20
10
0
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado
Tumor
PBMC
Baço
CD4 de memória central
% de células T CD62L+ CD44+ CD4+ (de CD4+ viva)
CD4 virgem
% de células T CD62L+ CD44+ CD4+ (de CD4+ viva)
25
20
15
5

Figura 25 (continuação)

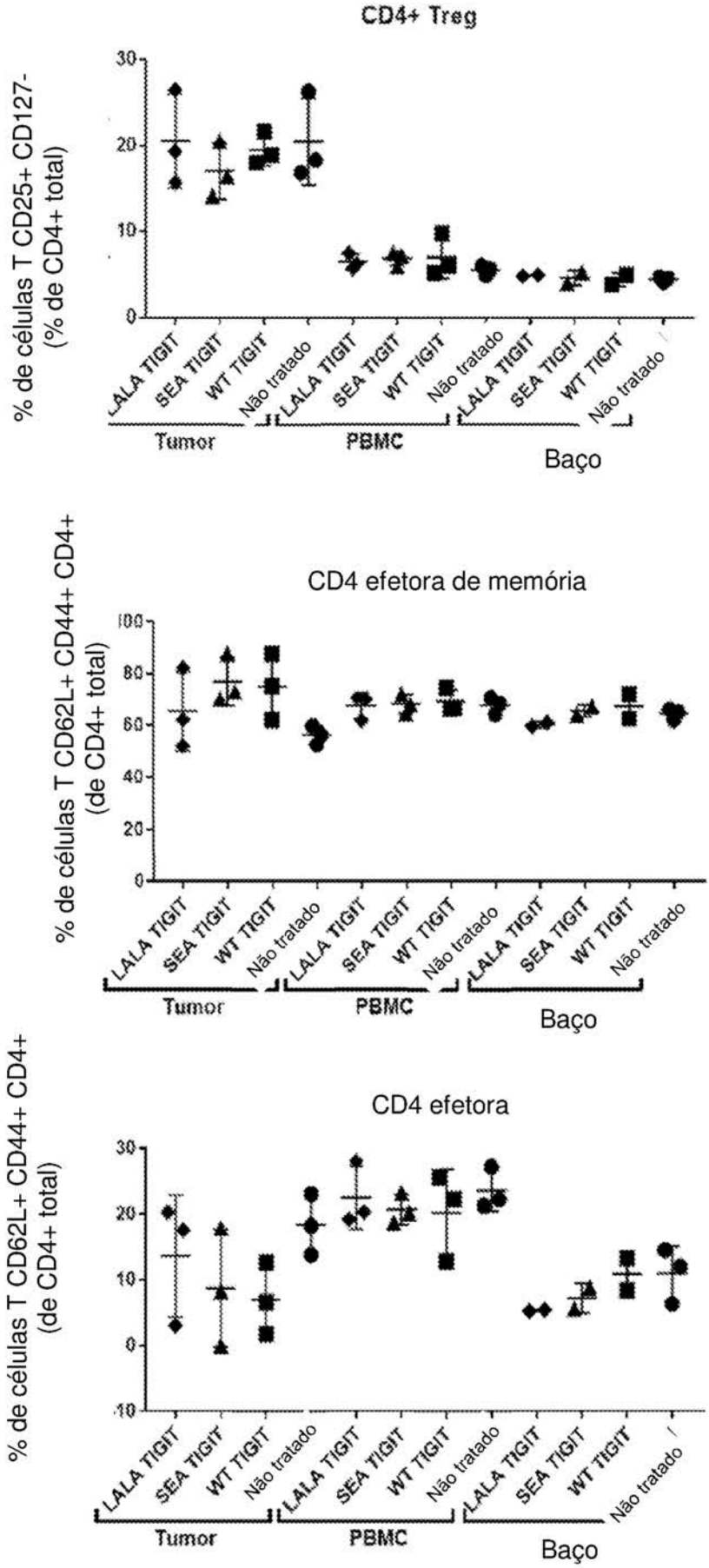


Figura 26A

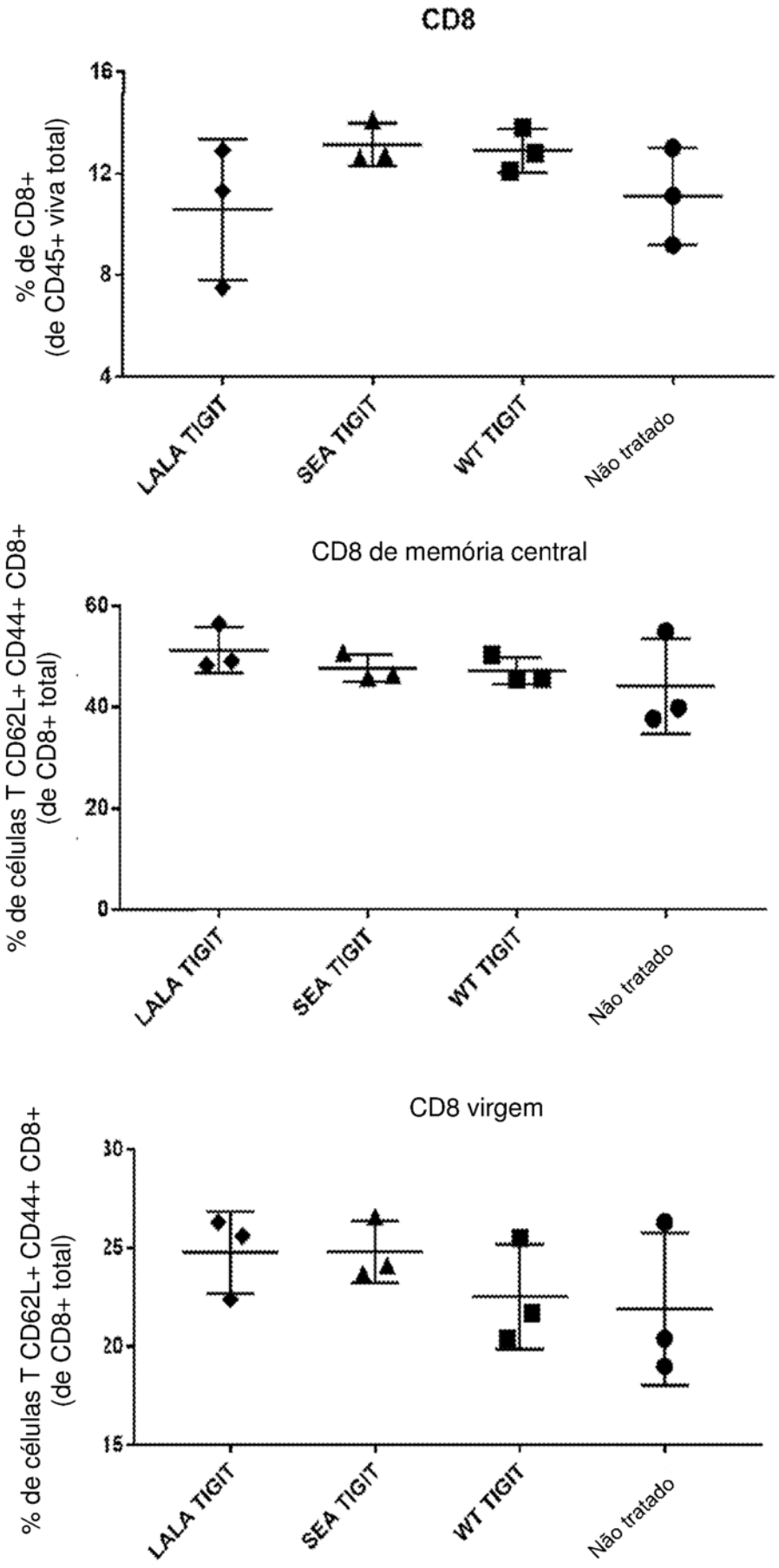

CD8
% de CD8+
(de CD45+ viva total)
16
12
8
4
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado
CD8 de memória central
% de células T CD62L+ CD44+ CD8+
(de CD8+ total)
60
40
20
0
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado
CD8 virgem
% de células T CD62L+ CD44+ CD8+
(de CD8+ total)
30
25
20
15
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado

Figura 26A (continuação)

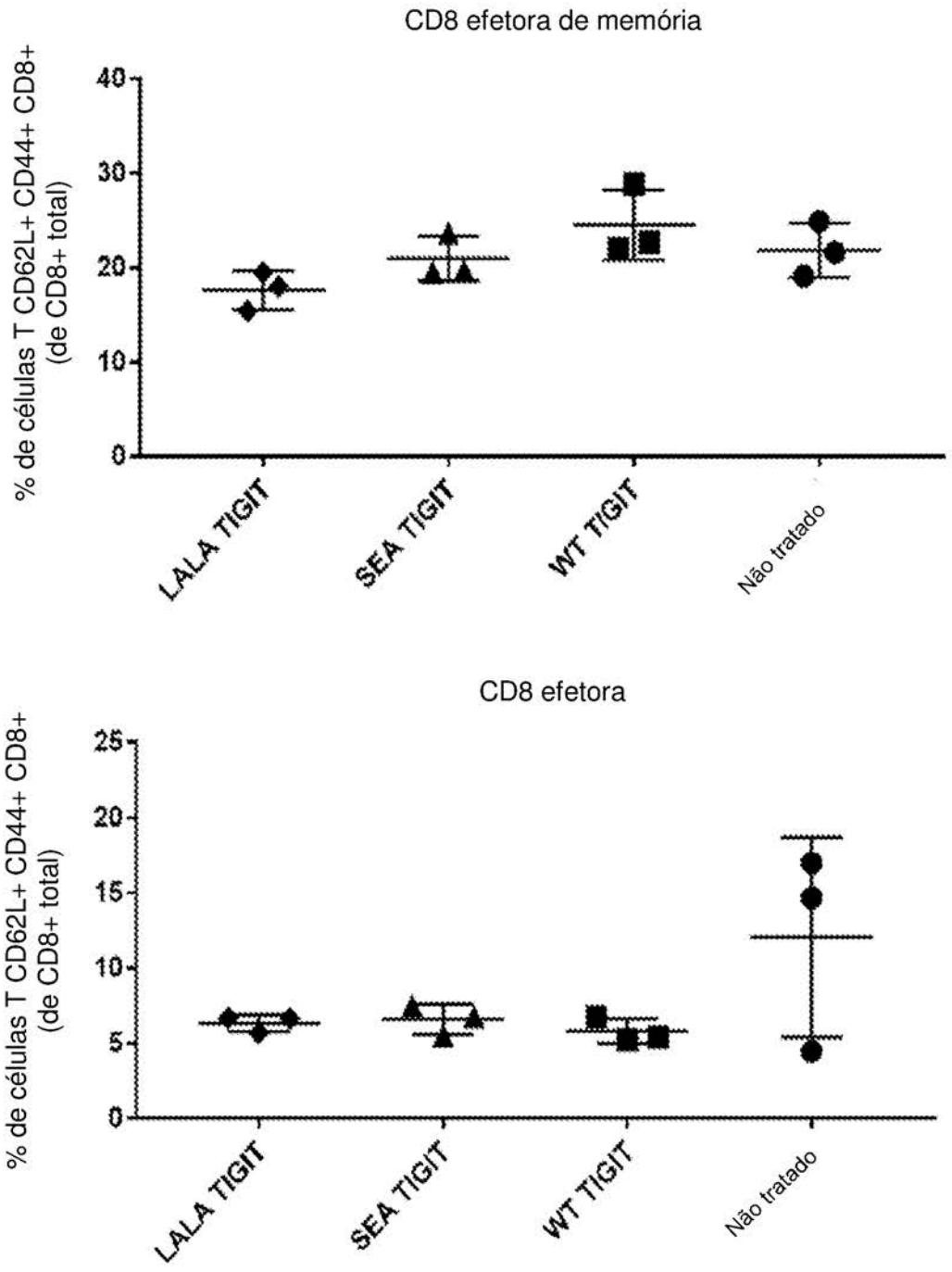


Figura 26B

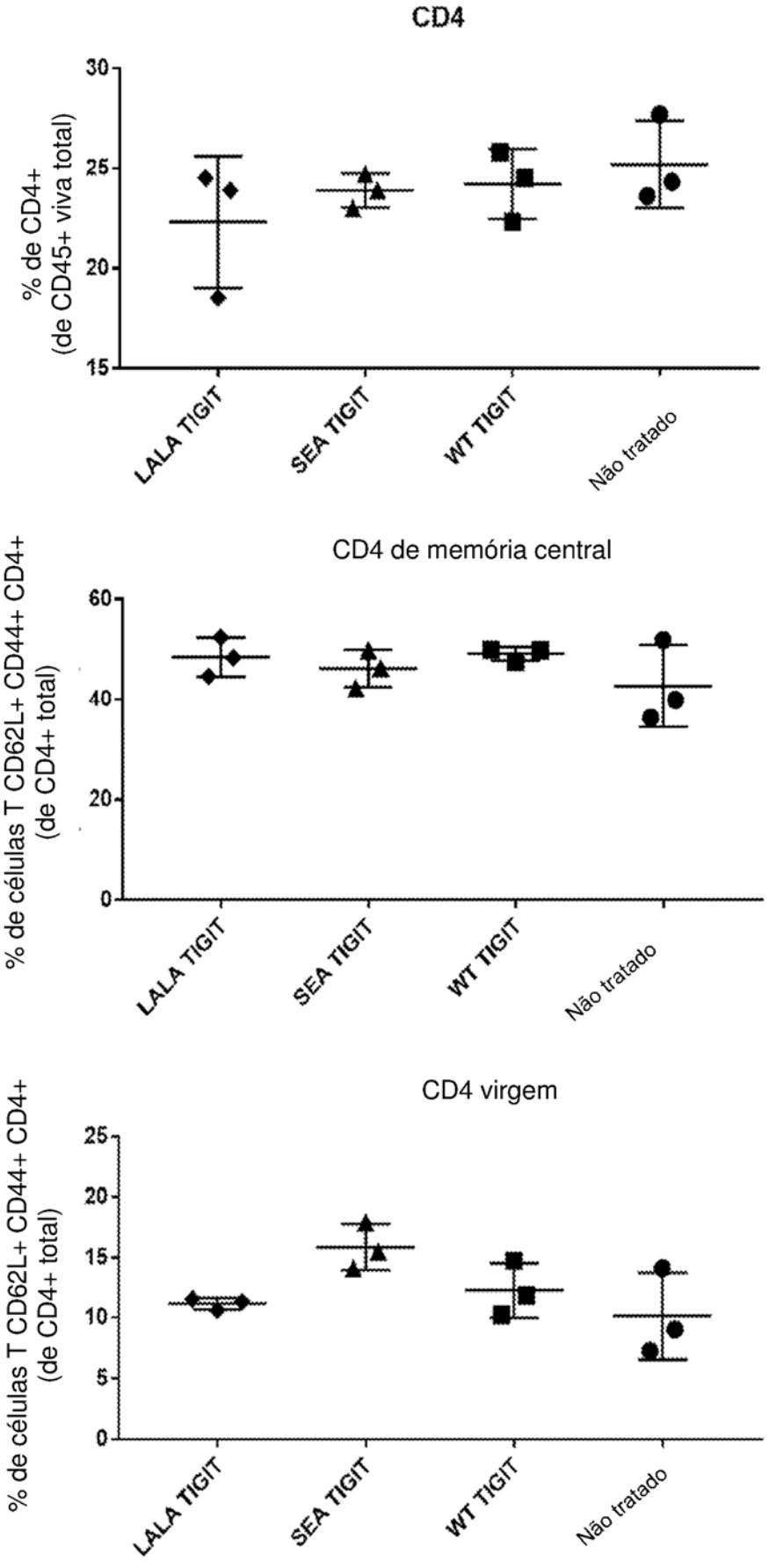

CD4
% de CD4+
(de CD45+ viva total)
30
25
20
15
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado
CD4 de memória central
% de células T CD62L+ CD44+ CD4+
(de CD4+ total)
60
40
20
0
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado
CD4 virgem
% de células T CD62L+ CD44+ CD4+
(de CD4+ total)
25
20
15
10
5
0
LALA TIGIT
SEA TIGIT
WT TIGIT
Não tratado

Figura 26B (continuação)

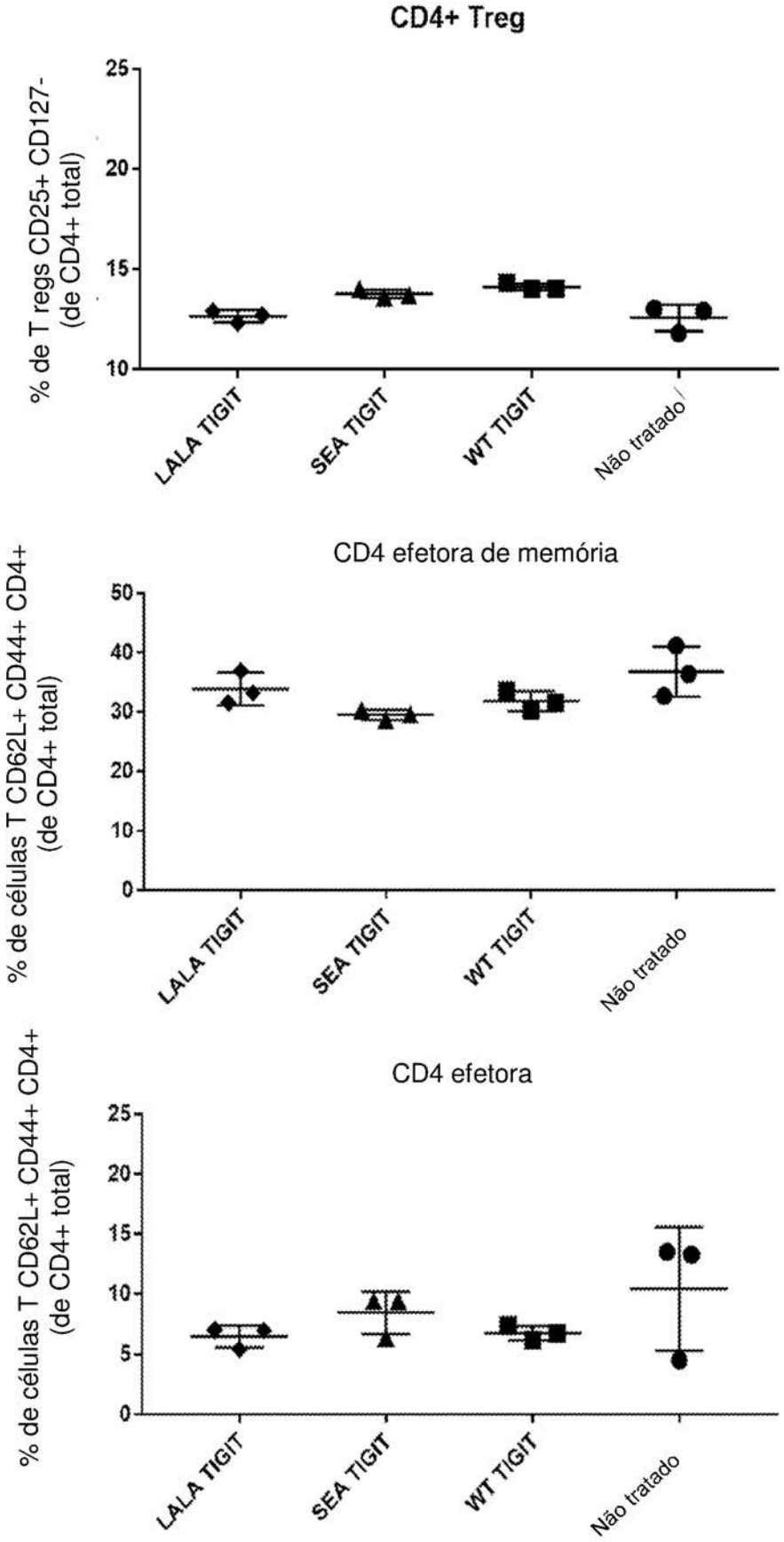


Figura 27

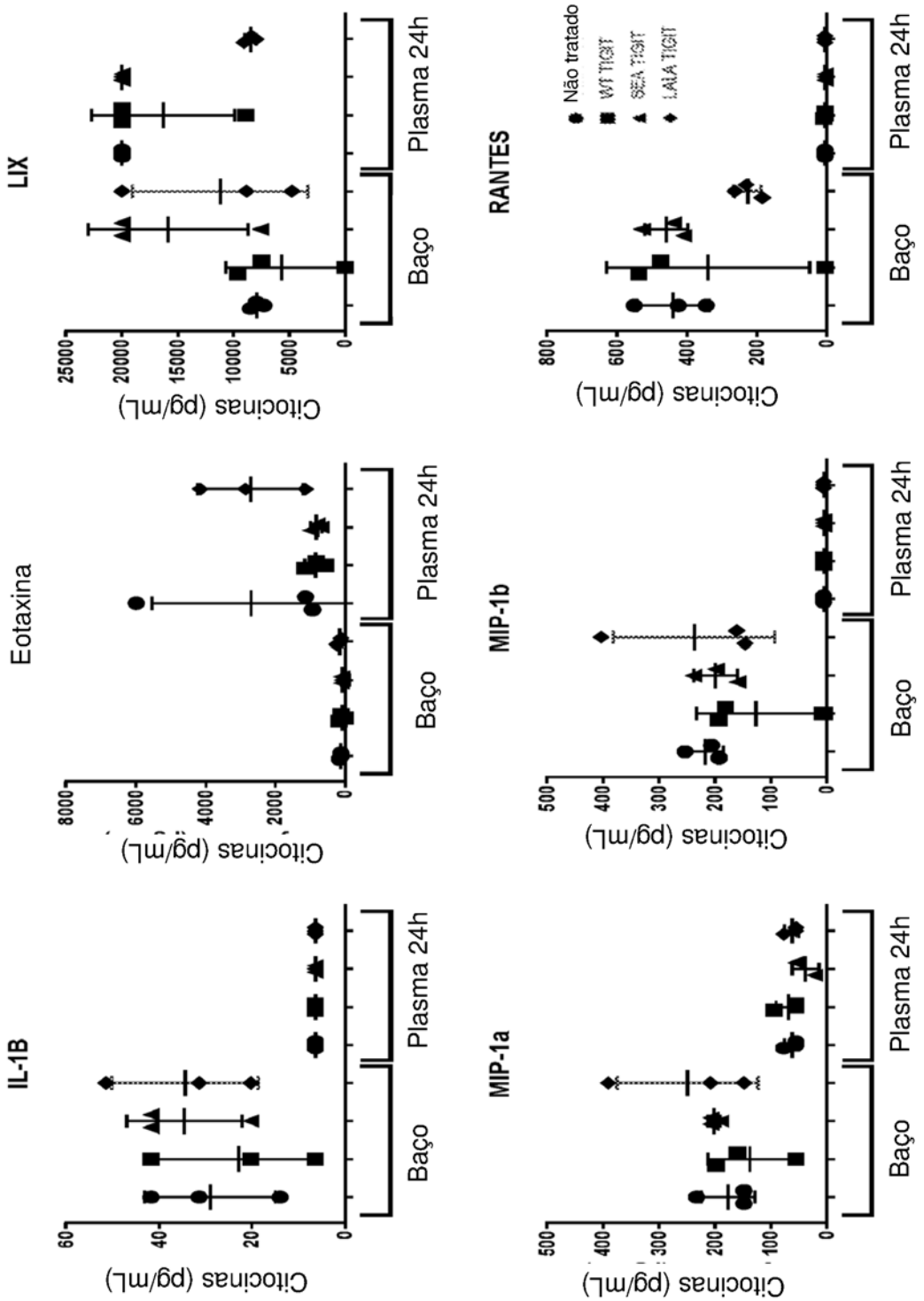

IL-1B
Eotaxina
LIX
MIP-1a
MIP-1b
RANTES
Não tratado
Citocinas (pg/mL)
Baço
Plasma 24h

Figura 28

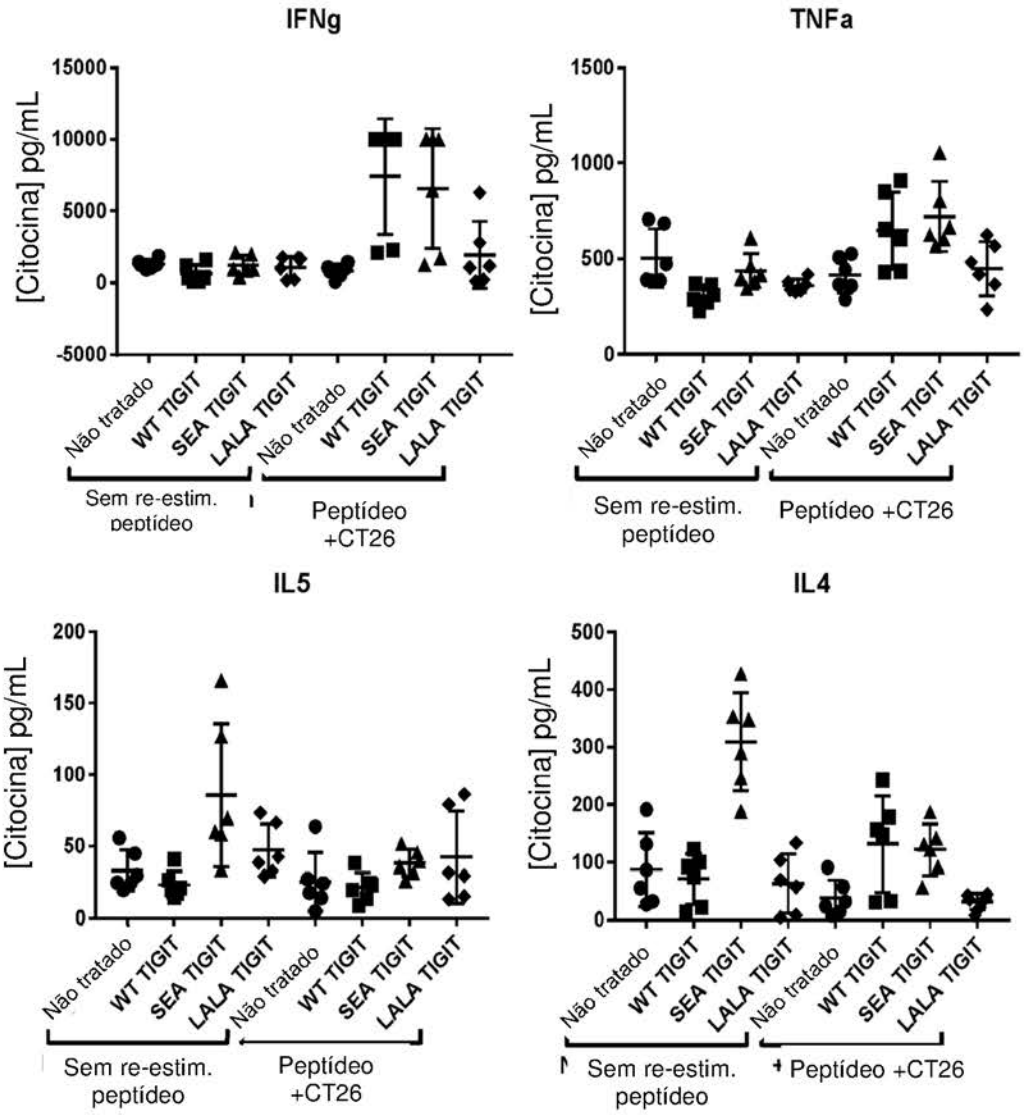
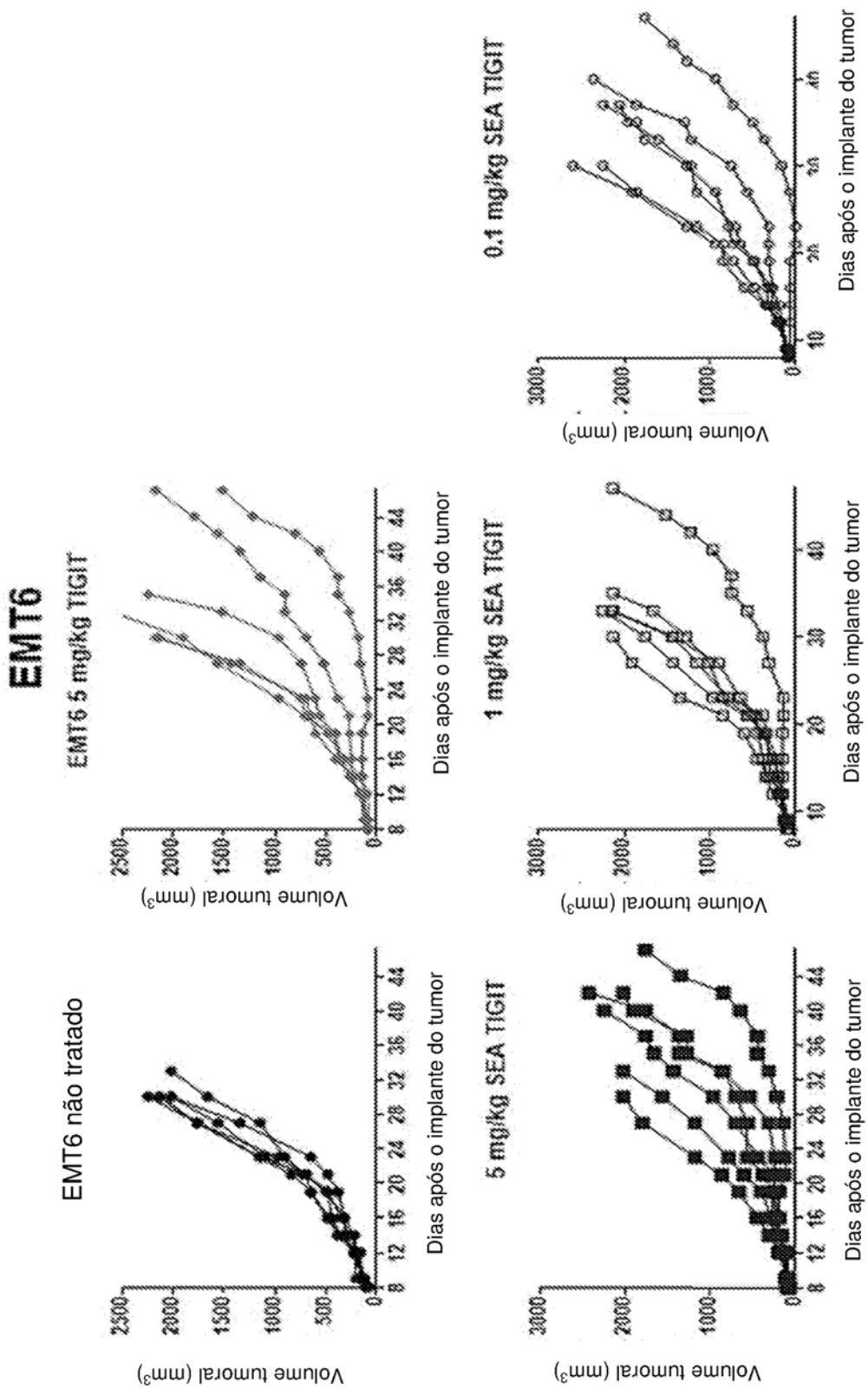

IFNg
TNFa
IL5
IL4
[Citocina] pg/mL
Não tratado
WT TIGIT
SEA TIGIT
LALA TIGIT
Sem re-estim. peptídeo
Peptídeo +CT26

Figura 29A


EMT6
EMT6 não tratado
EMT6 5 mg/kg TIGIT
0.1 mg/kg SEA TIGIT
1 mg/kg SEA TIGIT
5 mg/kg SEA TIGIT
Volume tumoral (mm³)
Dias após o implante do tumor

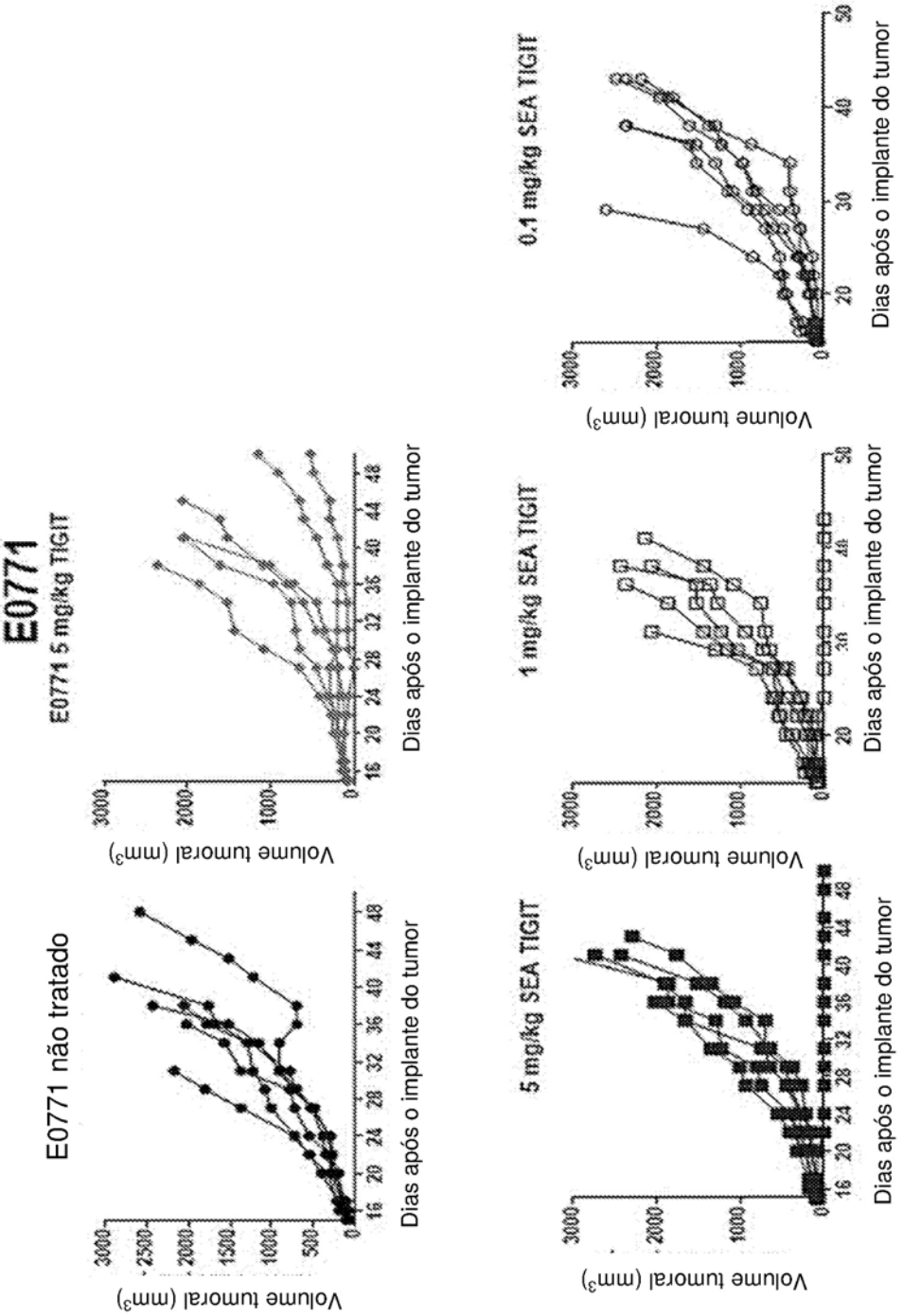

E0771
E0771 não tratado
E0771 5 mg/kg TIGIT
5 mg/kg SEA TIGIT
1 mg/kg SEA TIGIT
0.1 mg/kg SEA TIGIT
Volume tumoral (mm3)
Dias após o implante do tumor

Figura 29B

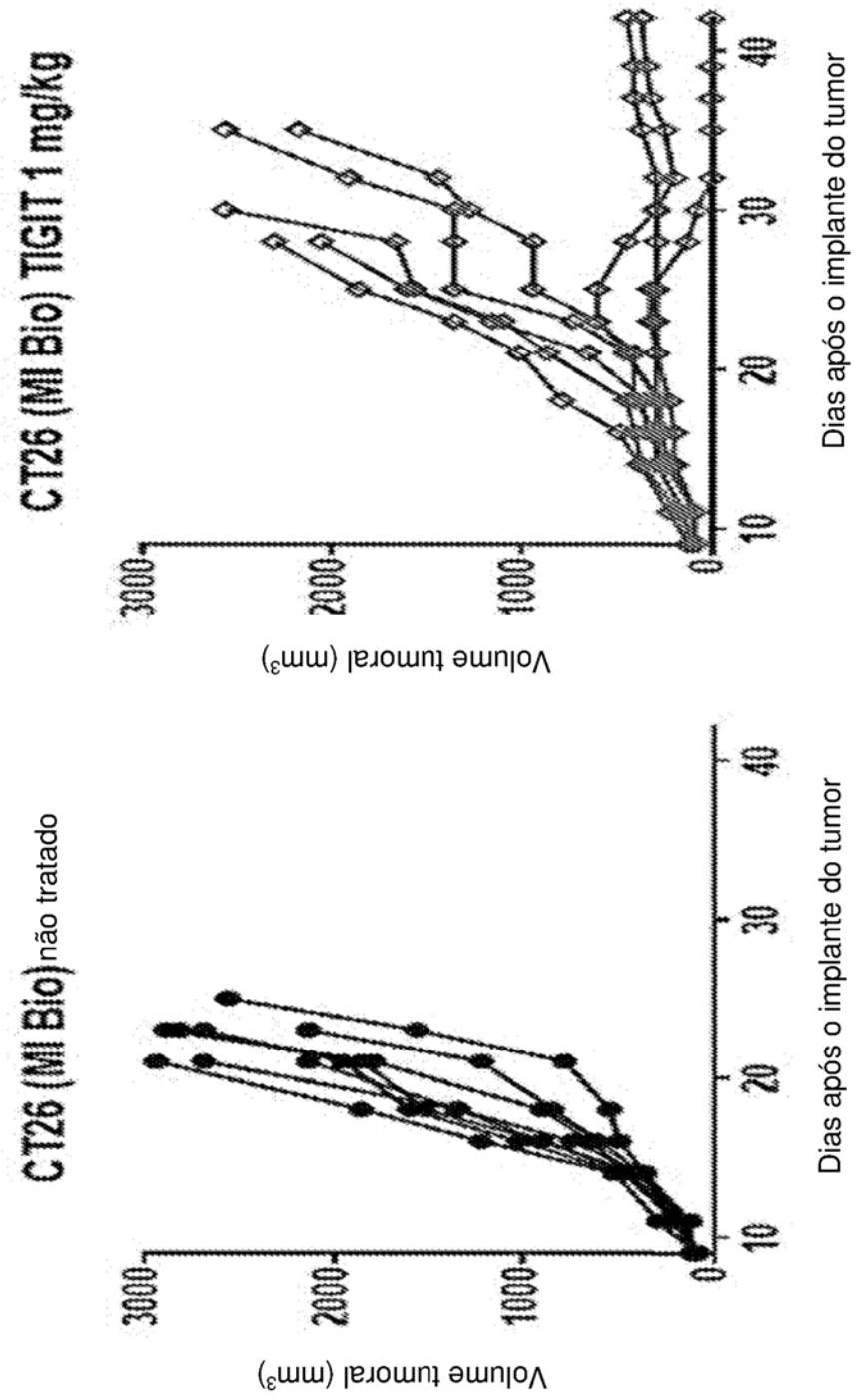

CT26 (MI Bio) não tratado
Volume tumoral (mm³)
3000
2000
1000
0
10
20
30
40
Dias após o implante do tumor
CT26 (MI Bio) TIGIT 1 mg/kg
Volume tumoral (mm³)
3000
2000
1000
0
10
20
30
40
Dias após o implante do tumor

Figura 29C

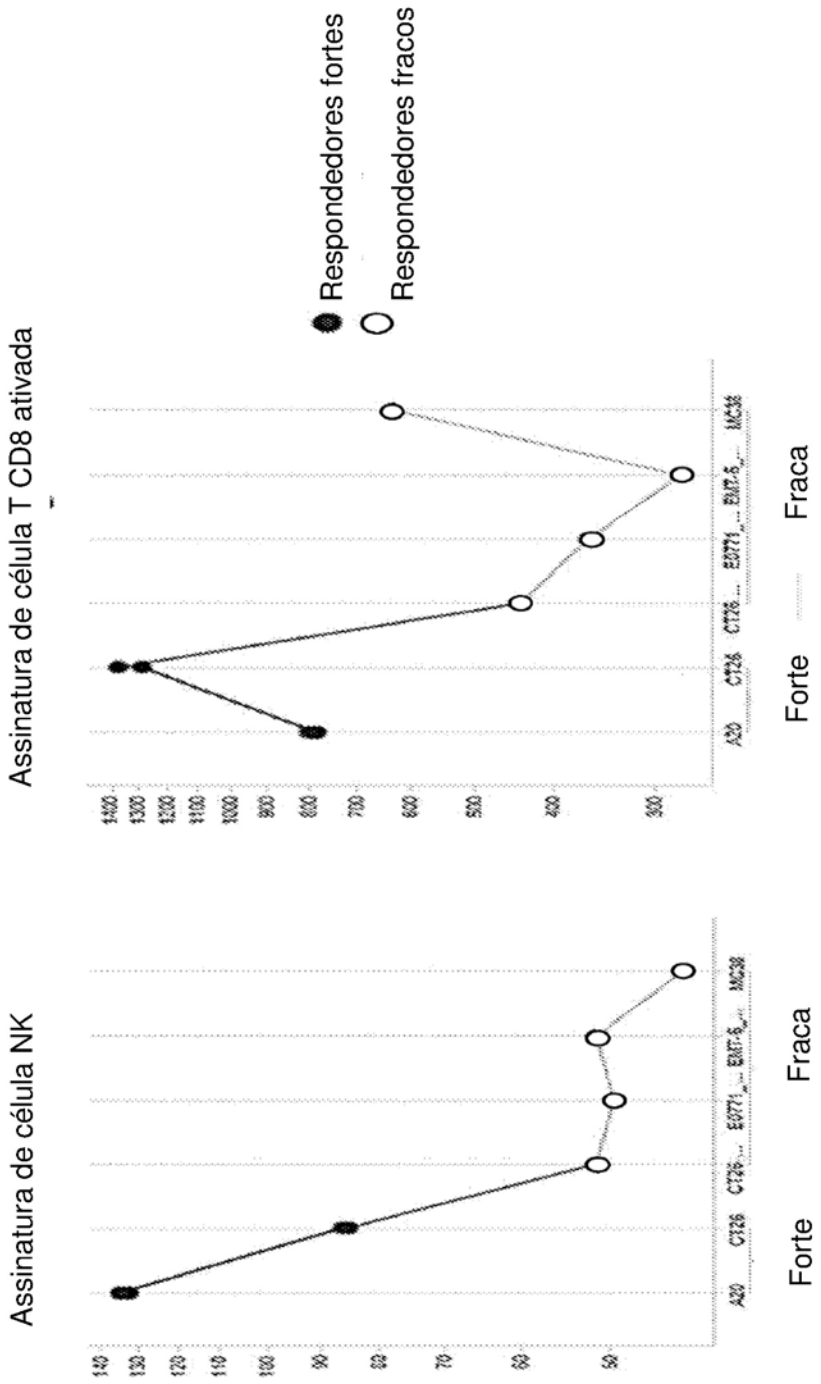

Assinatura de célula T CD8 ativada
Respondedores fortes
Respondedores fracos
Forte
Fraca
Assinatura de célula NK
Forte
Fraca

Figura 30

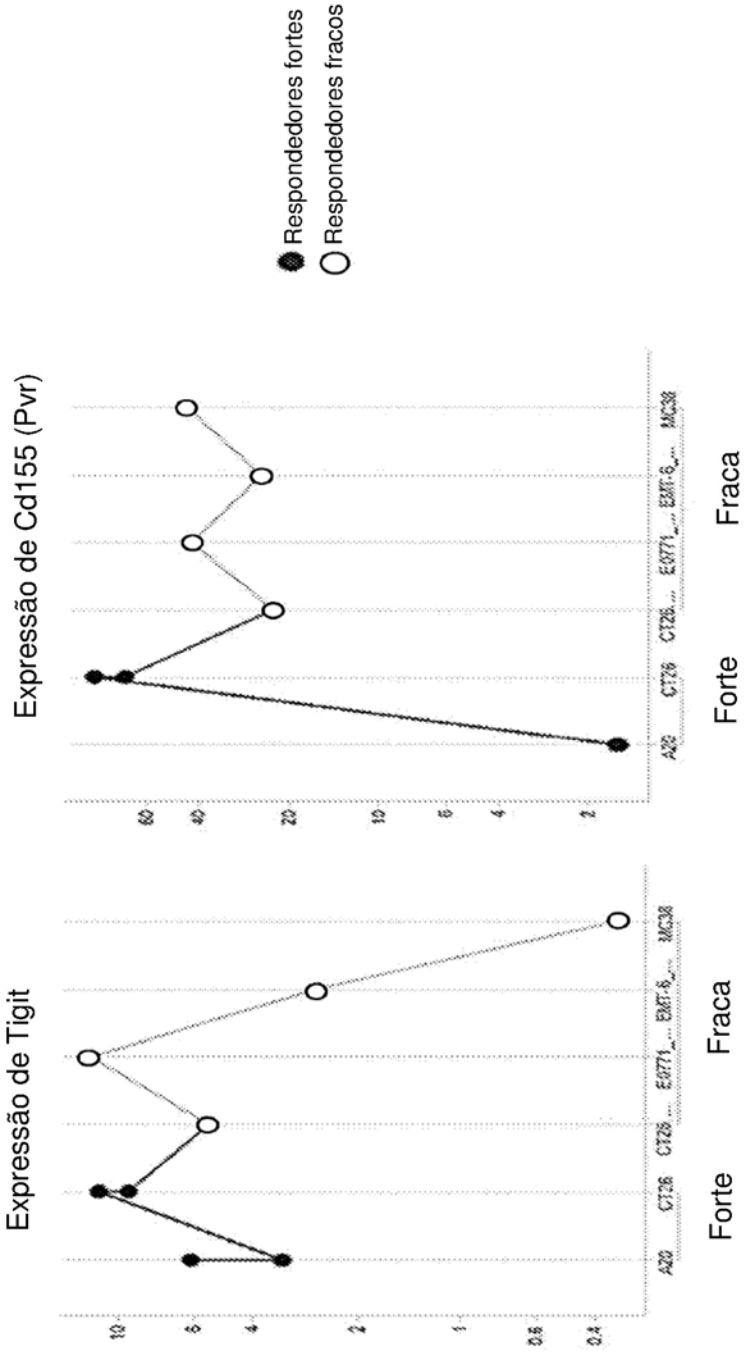

Respondedores fortes
Respondedores fracos
Expressão de Cd155 (Pvr)
Expressão de Tigit
Forte
Fraca
Forte
Fraca

Figura 31

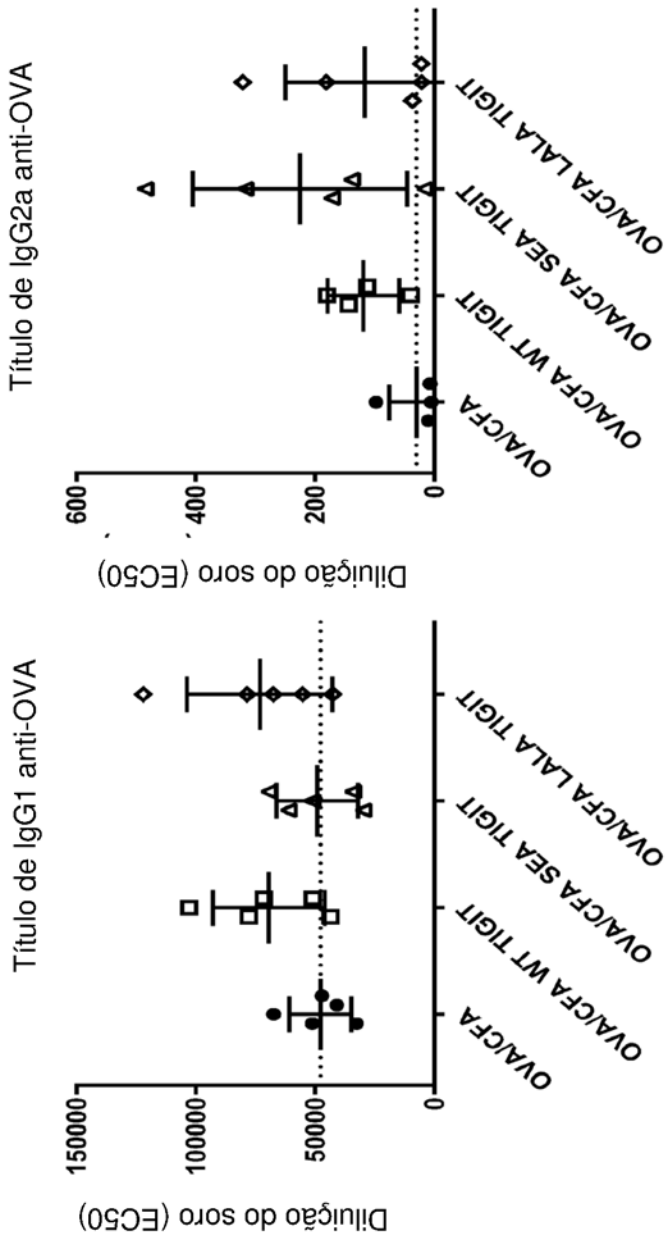

Título de IgG2a anti-OVA
Diluição do soro (EC50)
600
400
200
0
OVA/CFA
OVA/CFA WT TIGIT
OVA/CFA SEA TIGIT
OVA/CFA LALA TIGIT
Título de IgG1 anti-OVA
Diluição do soro (EC50)
150000
100000
50000
0
OVA/CFA
OVA/CFA WT TIGIT
OVA/CFA SEA TIGIT
OVA/CFA LALA TIGIT

Figura 32

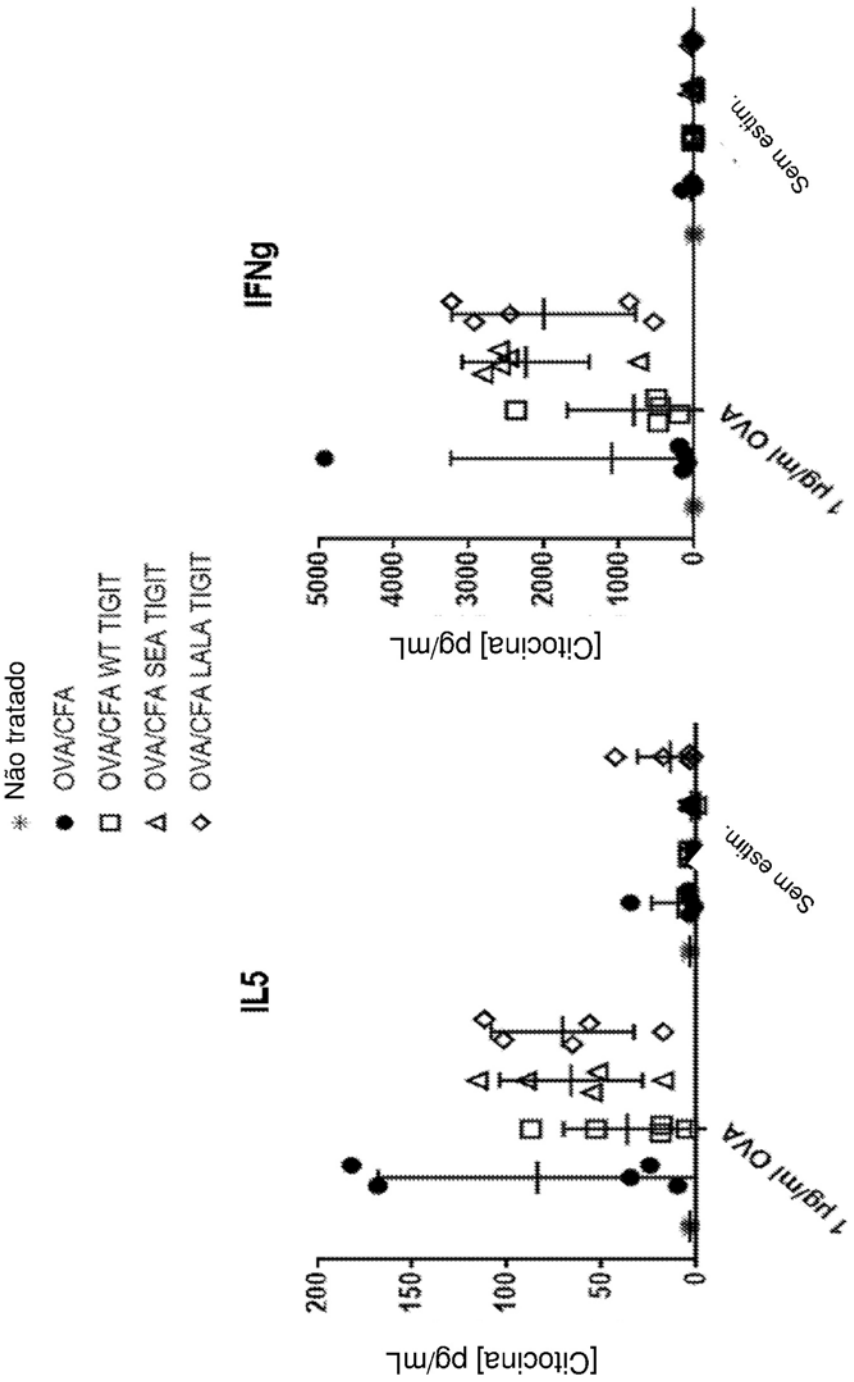
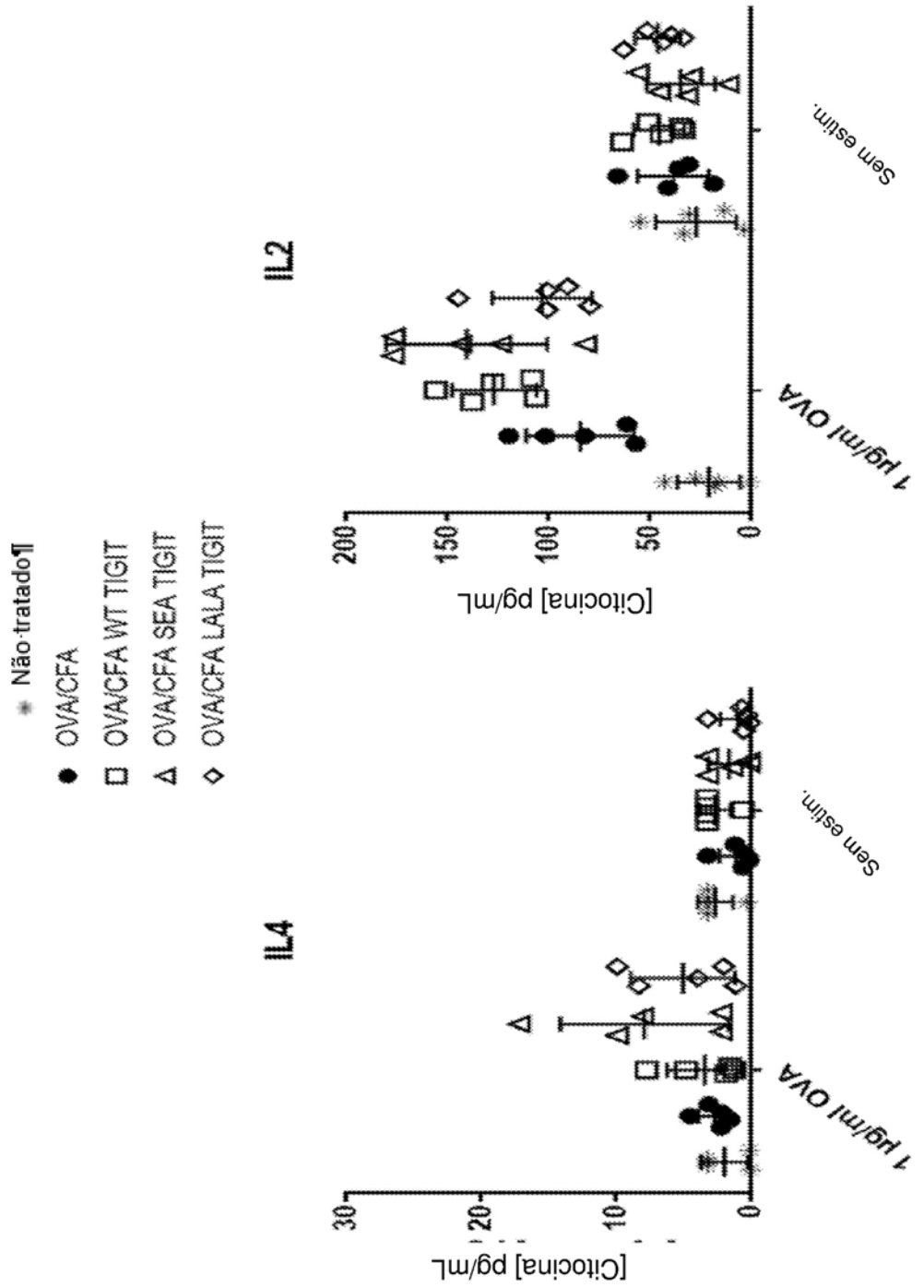

Não tratado
OVA/CFA
OVA/CFA WT TIGIT
OVA/CFA SEA TIGIT
OVA/CFA LALA TIGIT
IL5
IFNg
[Citocina] pg/mL
200
150
100
50
0
5000
4000
3000
2000
1000
1 µg/ml OVA
Sem estim.

Figura 33

Figura 33 (continuação)



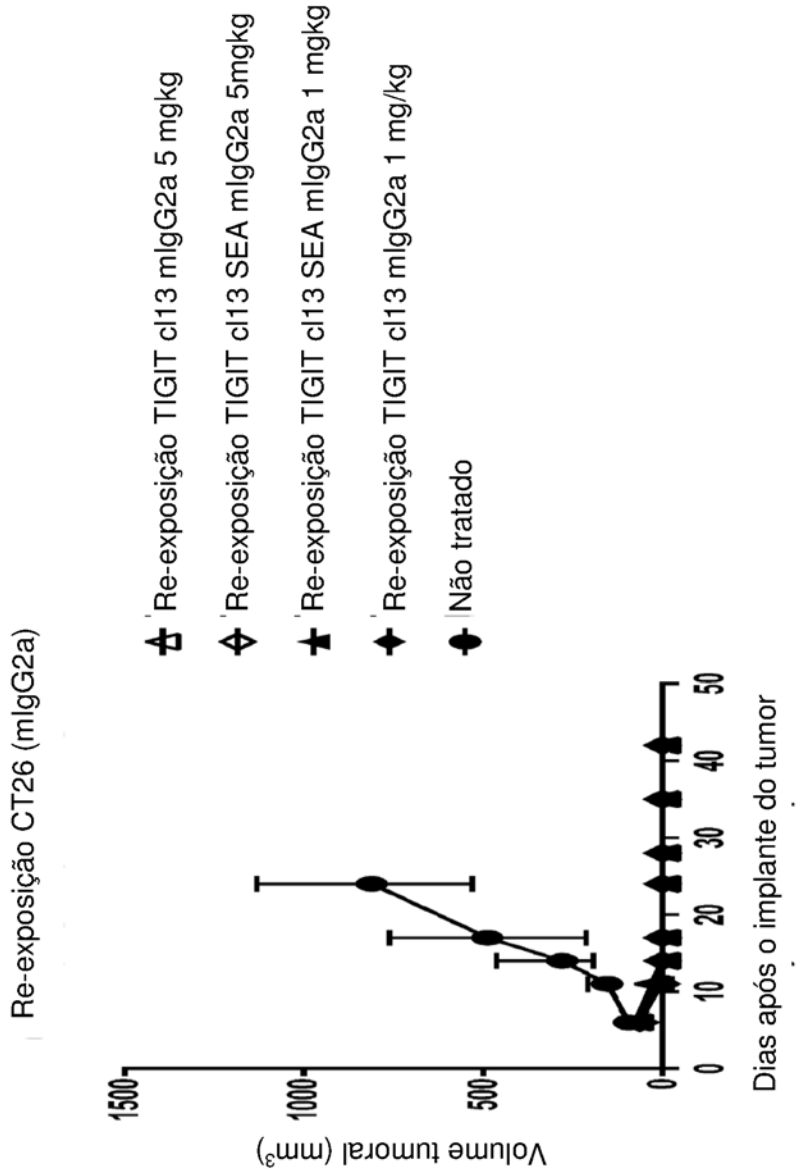

Re-exposição CT26 (mIgG2a)
Re-exposição TIGIT cl13 mIgG2a 5 mgkg
Re-exposição TIGIT cl13 SEA mIgG2a 5mgkg
Re-exposição TIGIT cl13 SEA mIgG2a 1 mgkg
Re-exposição TIGIT cl13 mIgG2a 1 mg/kg
Não tratado
Volume tumoral (mm³)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o implante do tumor

Figura 34

Figura 35

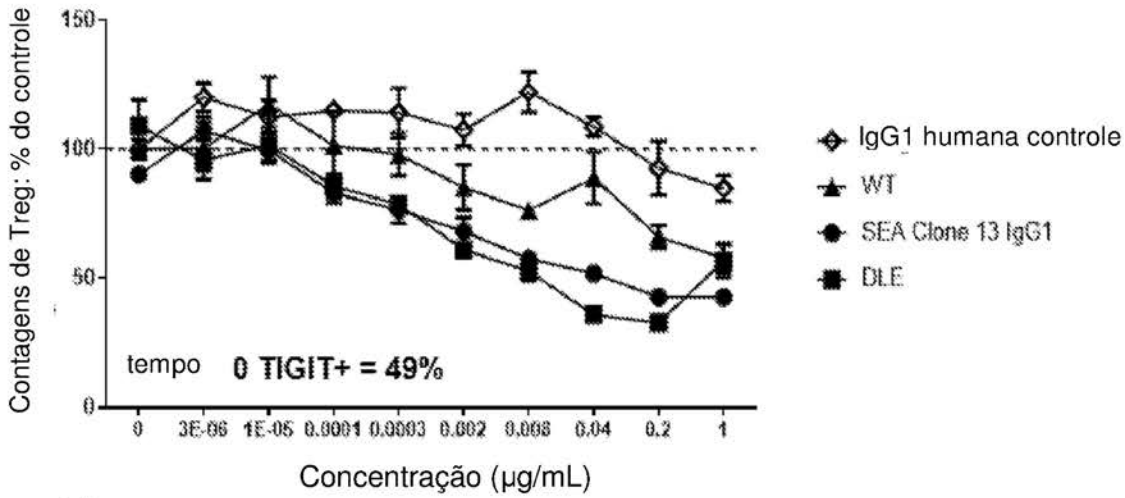
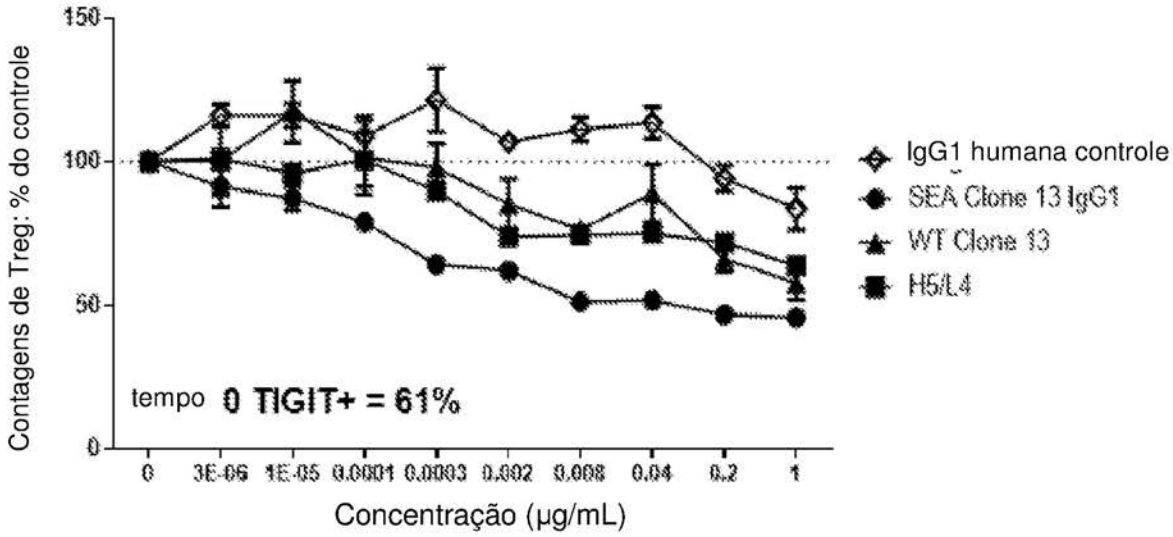


Figura 36



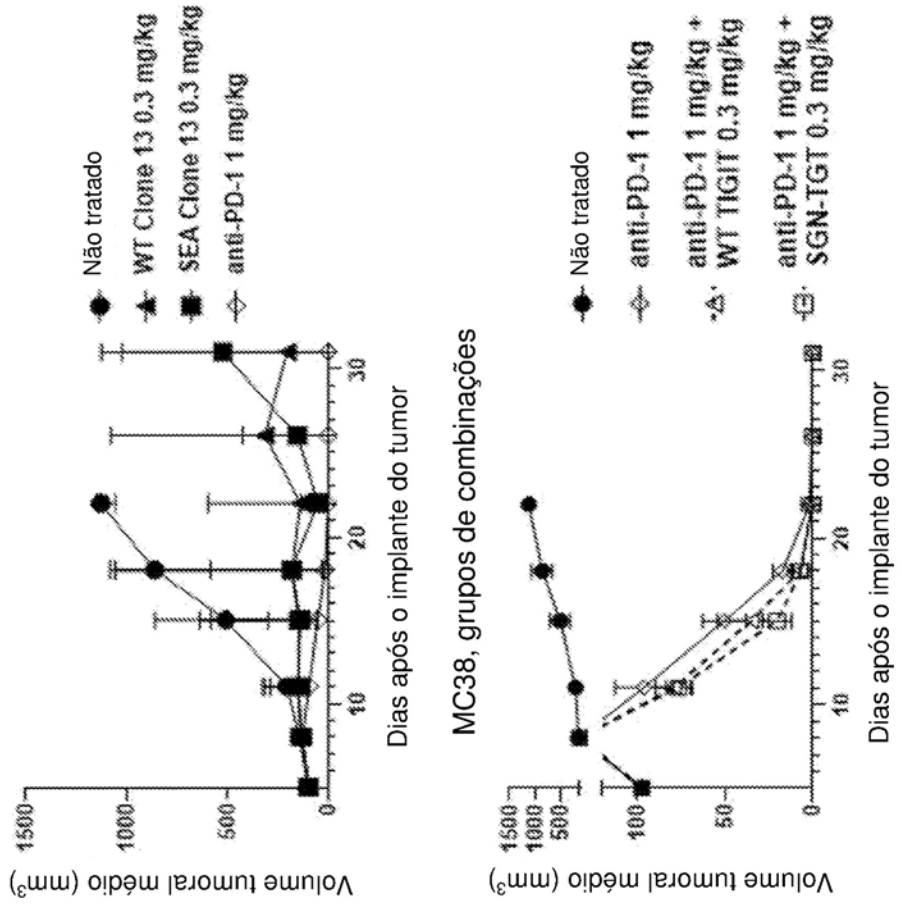

MC38, grupos de agentes únicos
Não tratado
WT Clone 13 0.3 mg/kg
SEA Clone 13 0.3 mg/kg
anti-PD-1 1 mg/kg
Volume tumoral médio (mm³)
Dias após o implante do tumor
MC38, grupos de combinações
Não tratado
anti-PD-1 1 mg/kg
anti-PD-1 1 mg/kg + WT TIGIT 0.3 mg/kg
anti-PD-1 1 mg/kg + SGN-TGT 0.3 mg/kg
Volume tumoral médio (mm³)
Dias após o implante do tumor

Figura 37

Figura 37 (continuação)

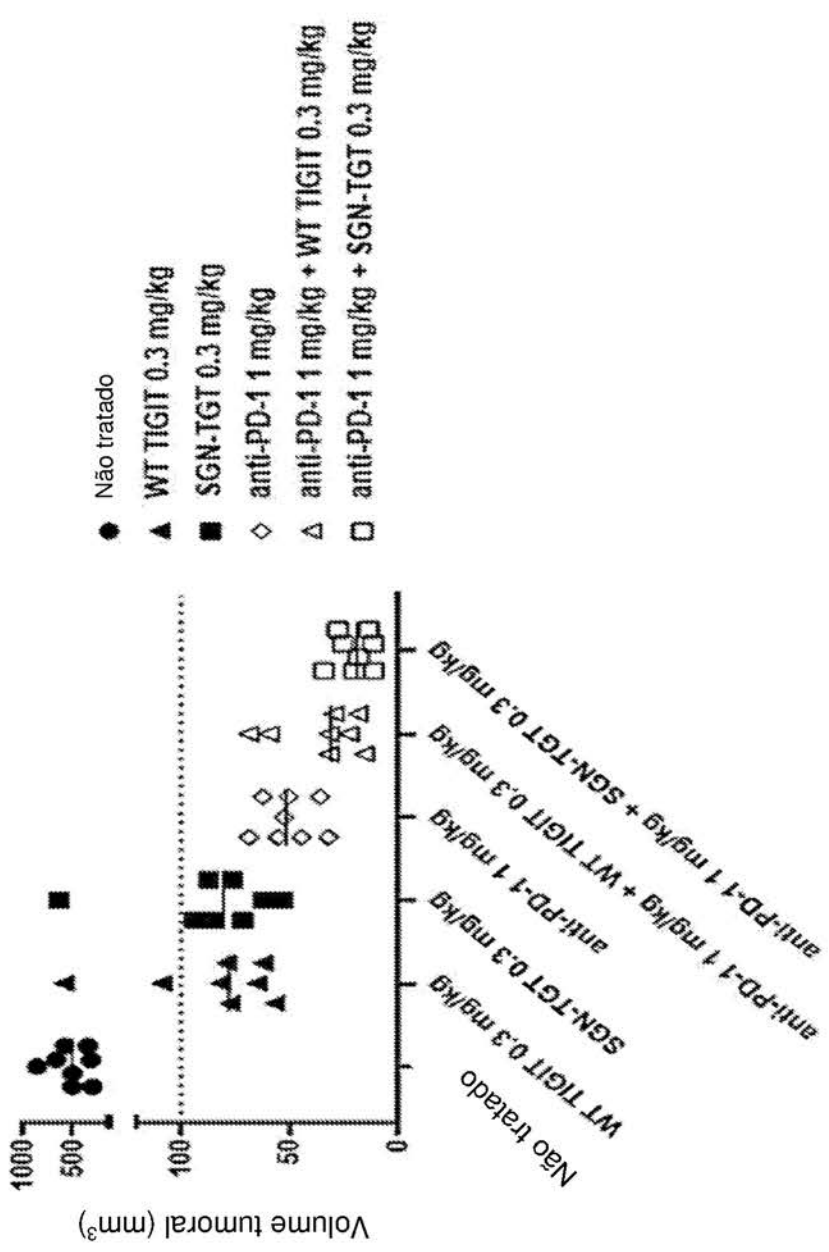


Figura 38A

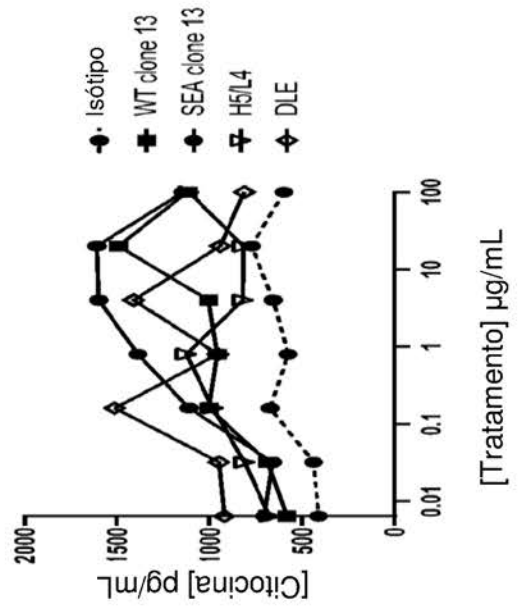


Figura 38B

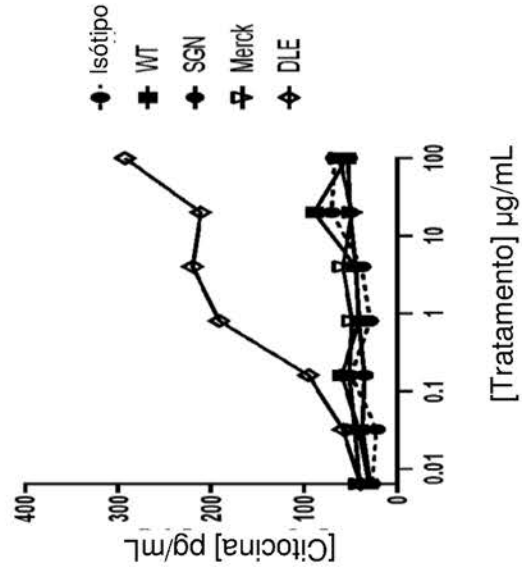


Figura 39A

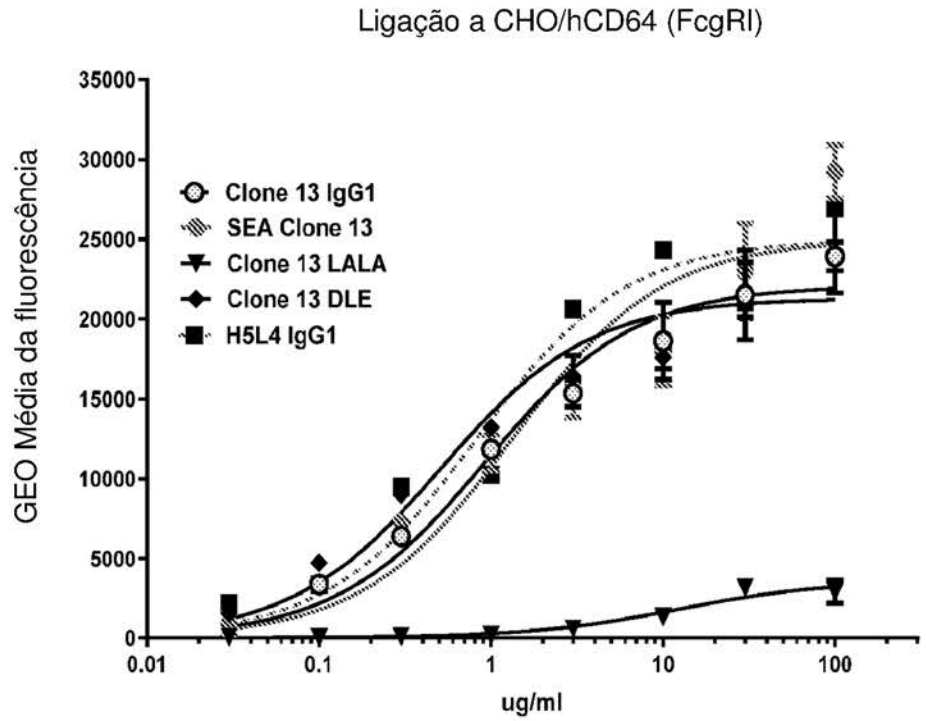


Figura 39B

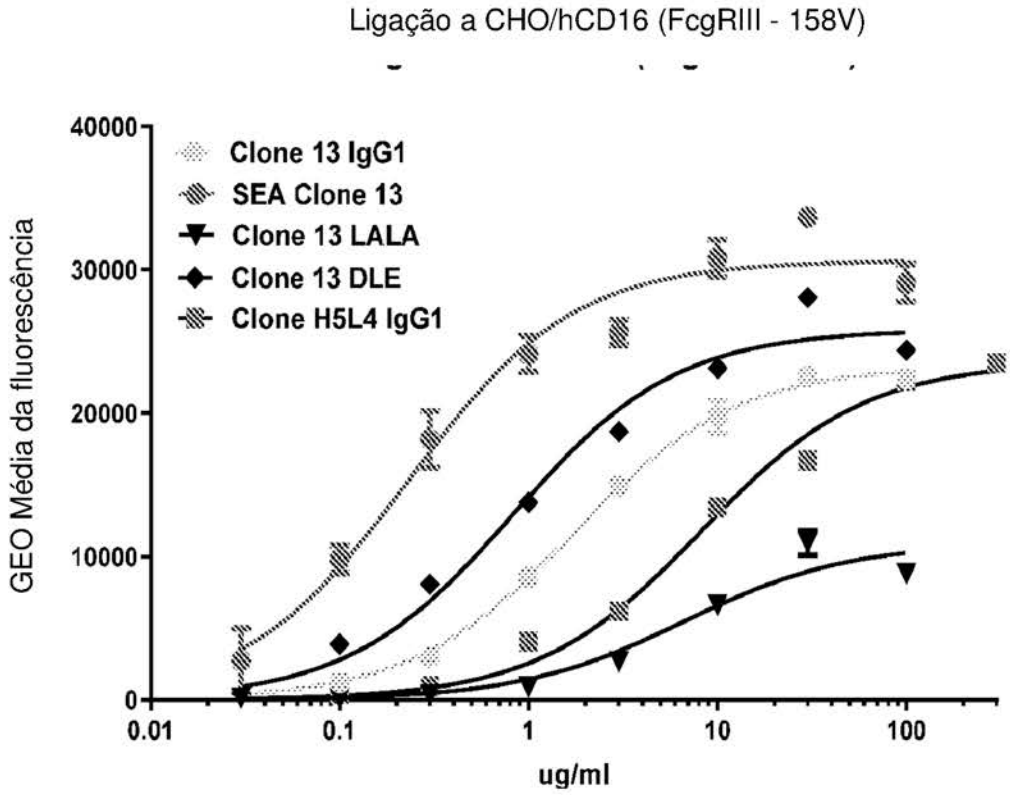


Figura 39C

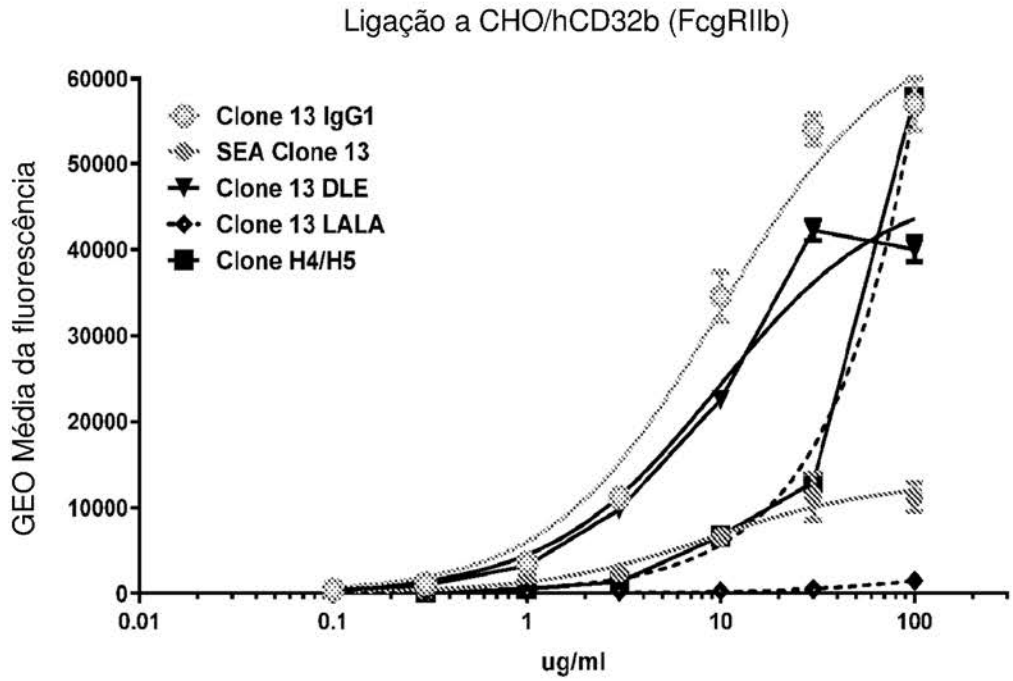


Figura 39D

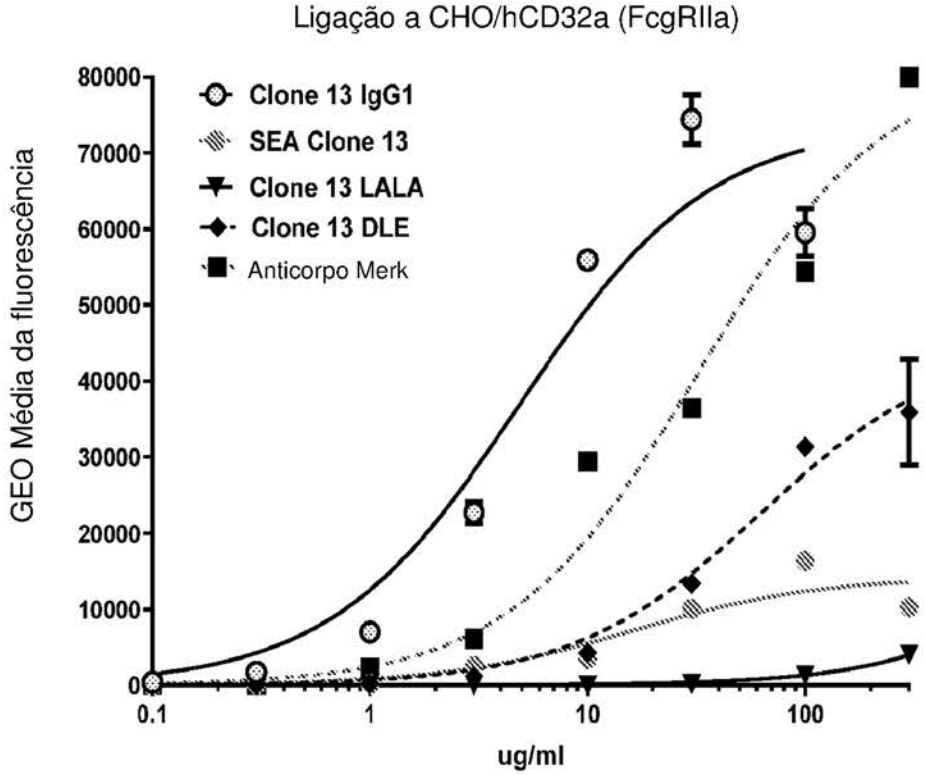


Figura 40

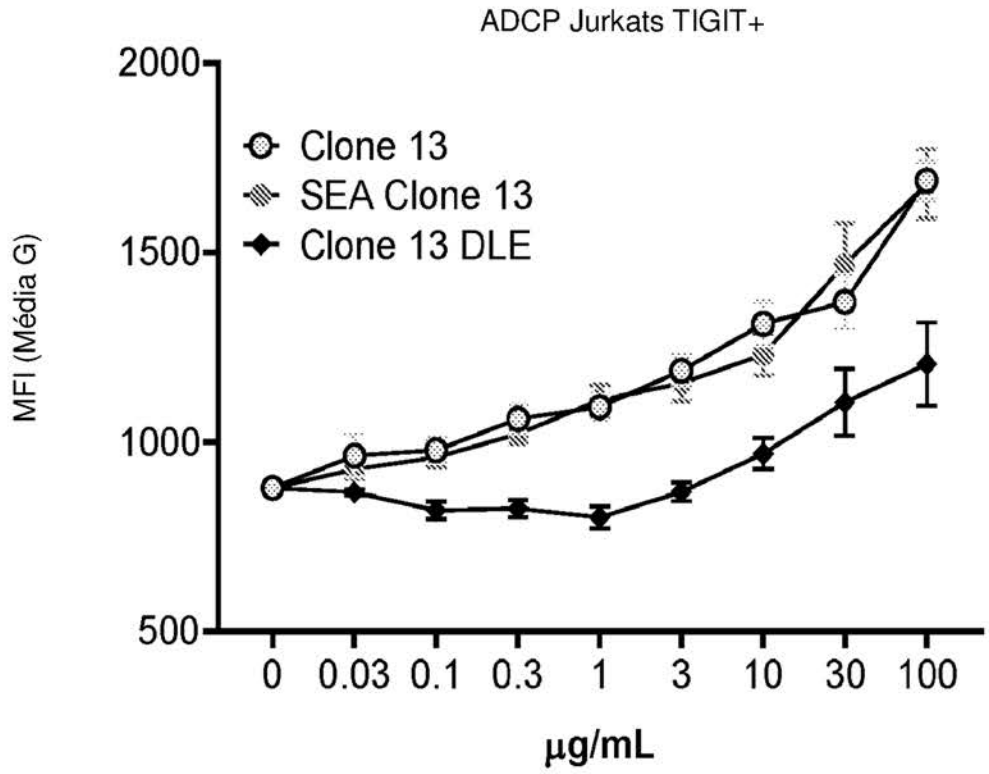
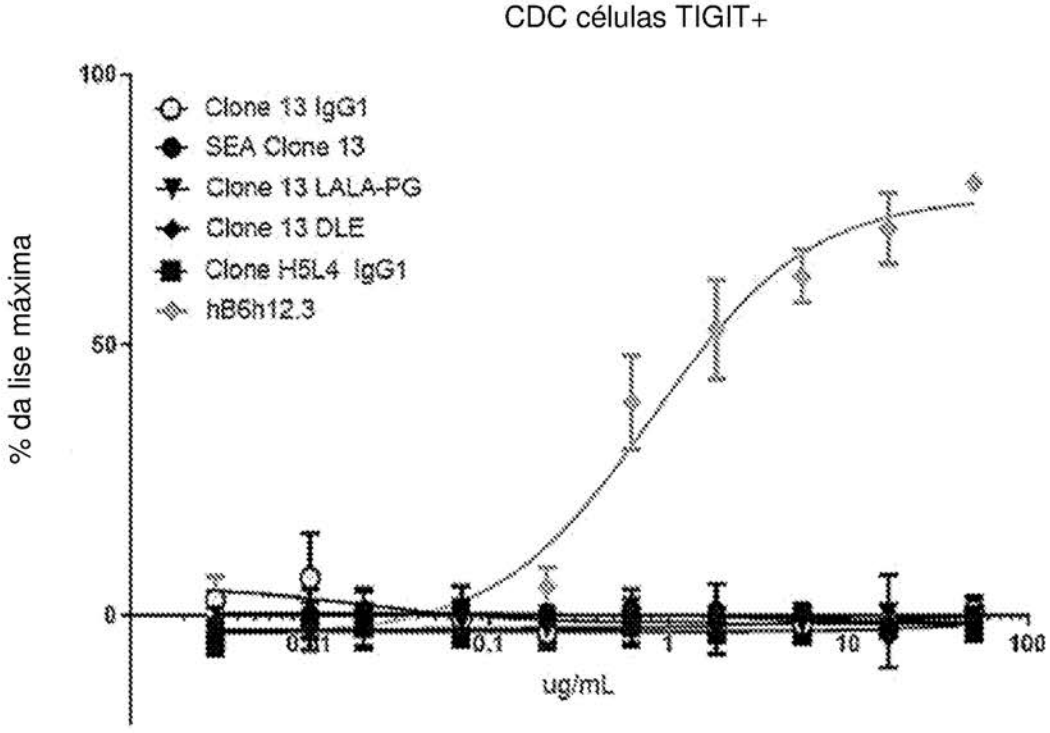


Figura 41



RESUMO

COMPOSIÇÃO, ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA AO TIGIT HUMANO E DE ANTICORPOS AFUCOSILADOS QUE SE LIGAM A TIGIT E PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, E, KIT

A presente invenção provê anticorpos isolados que se ligam a TIGIT humano (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM). Em algumas modalidades, o anticorpo tem uma afinidade de ligação (K_D) por TIGIT humano inferior a 5 nM. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT bloqueia a ligação de CD155 e/ou CD112 a TIGIT. Em algumas modalidades, os anticorpos são afucosilados.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 142982list seq.txt
- Data de Geração do Código: 19/02/2021
- Hora de Geração do Código: 17:22:09
- Código de Controle:
  - Campo 1: A15542CDB4F9B444
  - Campo 2: 55D127224430177A