

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 533**

51 Int. Cl.:

A61P 37/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2009 PCT/US2009/039868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09126688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09730709 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2279412**

54 Título: **Composiciones y métodos novedosos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad**

30 Prioridad:

09.04.2008 US 123530 P
26.09.2008 US 194271 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

CLARK, HILARY;
EATON, DAN;
GONZALEZ, LINO, JR.;
GROGAN, JANE, L.;
HACKNEY, JASON;
HARDEN, KRISTIN, D. y
YU, XIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 533 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos novedosos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad.

10 Antecedentes de la invención

Las enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamatorias son la manifestación o consecuencia de vías biológicas bastante complejas, frecuentemente, con múltiples interconexiones, que en la fisiología normal, son críticas para responder a un traumatismo o lesión, iniciar la reparación del traumatismo o lesión, y generar la
15 defensa innata y adquirida contra organismos extraños. La enfermedad o patología ocurre cuando estas vías fisiológicas normales causan un traumatismo o lesión adicional, ya sea relacionado directamente con la intensidad de la respuesta, como una consecuencia de la regulación anormal o estimulación excesiva, como una reacción autóloga, o como una combinación de éstos.

20 Aunque la génesis de estas enfermedades frecuentemente involucra trayectorias de múltiples etapas y frecuentemente múltiples sistemas/vías biológicas diferentes, la intervención en puntos críticos en una o más de estas vías puede tener un efecto de mejora o terapéutico. La intervención terapéutica puede ocurrir mediante o bien el antagonismo de un proceso/vía perjudicial o bien la estimulación de un proceso/vía beneficioso.

25 Se conocen muchas enfermedades relacionadas con la inmunidad y se han estudiado de manera extensa. Tales enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por la inmunidad, enfermedades inflamatorias mediadas no por la inmunidad, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

Los linfocitos T (células T) son un componente importante de una respuesta inmunitaria de un mamífero. Las células
30 T reconocen los antígenos que están asociados con una molécula autóloga codificada por los genes dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El antígeno puede presentarse junto con moléculas del MHC en la superficie de las células presentadoras de antígenos, células infectadas con virus, células cancerosas, injertos, etc. El sistema de células T elimina estas células alteradas que plantean una amenaza para la salud del mamífero hospedador. Las células T incluyen las células T auxiliares y las células T citotóxicas. Las células T auxiliares
35 proliferan de manera extensa después del reconocimiento de un complejo antígeno-MHC en una célula presentadora de antígeno. Las células T auxiliares también secretan varias citocinas, es decir, linfocinas, que desempeñan una función principal en la activación de las células B, células T citotóxicas y varias otras células que participan en la respuesta inmunitaria. Otra subcategoría de las células T auxiliares son las células T auxiliares foliculares (T_{FH}) (para una revisión, véase Vineusa et al., Nat. Rev. Immunol. 5: 853-865 (2005)). Detectables por su
40 expresión característica del receptor 5 de CXCR-quimiocina (Schaerli et al., J. Exp. Med. 192: 1553-62 (2000)), se ha encontrado que estas células producen IL-10 y posiblemente IL-21. Las células T_{FH} proporcionan ayuda a las células B del centro germinal, particularmente ayudando en la supervivencia y propagación de las células B e induciendo posiblemente la producción de anticuerpos durante el cocultivo con células B. También participan en la
45 tolerogénesis.

Las células T reguladoras (T_{reg}) son un subconjunto de las células T auxiliares que desempeñan una función crítica en la inhibición de las respuestas inmunitarias autorreactivas, y se encuentran frecuentemente en sitios de inflamación crónica, tales como en el tejido tumoral (Wang, H.Y. & Wang, R.F., Curr Opin Immunol 19, 217-23 (2007)). Las células T_{reg} se definen fenotípicamente por una alta expresión en la superficie celular de CD25, CTLA4,
50 GITR y neuropilina-1 (Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F., J Exp Med 192, 295-302 (2000); Sakaguchi, S., et al., J Immunol 155, 1151-64 (1995); Takahashi, T. et al., J Exp Med 192, 303-10 (2000); McHugh, R.S. et al., Immunity 16, 311-23 (2002); Bruder, D. et al., Eur J Immunol 34, 623-30 (2004)), y están bajo el control del factor de transcripción *FOXP3* (Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S., Science 299, 1057-61 (2003)). Las células T_{reg} realizan su función supresora en las células T activadas a través de mecanismos dependientes del contacto y la producción de citocinas (Fehervari, Z. & Sakaguchi, Curr Opin Immunol 16, 203-8 (2004)). Las T_{reg} también modulan las respuestas
55 inmunitarias mediante la interacción directa con ligandos en células dendríticas (DC), tales como la interacción de CTLA4 con moléculas B7 en las DC que provoca la inducción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (Fallarino, F. et al., Nat Immunol 4, 1206-12 (2003)), y la ligación de CD40L (Serra, P. et al., Immunity 19, 877-89 (2003)). Las DC son células presentadoras de antígenos profesionales capaces de inducir inmunidad o tolerancia contra antígenos autólogos o no autólogos. Las T_{reg} expandidas por DC suprimen las respuestas de alorreactividad *in vitro* (Yamazaki, S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2758-63 (2006); Ahn, J.S., Krishnadas, D.K. & Agrawal, Int Immunol 19, 227-37 (2007)), y cuando se transfirieron de manera adoptiva, las T_{reg} apropiadas inhibieron la diabetes en ratones NOD.scid (Tarbell, K.V. et al., J Exp Med 199, 1467-77 (2004)), o asma experimentalmente inducido (Lewkowich, I.P. et al. J Exp Med 202, 1549-61 (2005)). Las interacciones específicas de ligandos en las DC con T_{reg} también
65 pueden anular su función supresora, tal como el acoplamiento de GITR en ratones (Shimizu, J., et al., Nat Immunol 3, 135-42 (2002)), sugiriendo que las DC pueden tener una función plural en la modulación de la función de T_{reg} .

Las moléculas de CTLA4 y GITR son representativas de los ligandos definidos dentro de las superfamilias de CD28-B7 y TNF de moléculas coestimuladoras/inhibidoras, respectivamente (Greenwald, R.J., et al., Annu Rev Immunol 23, 515-48 (2005)). Estas moléculas tienen un alto contenido de T_{reg}, pero también están reguladas por incremento normalmente en las células T activadas. Con el fin de buscar nuevas moléculas coestimuladoras expresadas en las células T_{reg}, se realizaron investigaciones para identificar genes específicamente expresados en células T (Abbas, A.R. et al., Genes Immun 6, 319-31 (2005)), que tenían ambos dominios de la Ig y motivos de activación o inhibición basados en tirosina del inmunorreceptor (ITAM/ITIM). A través de la intersección de estas dos estrategias de investigación bioinformática del genoma completo, se identificó una proteína unida a la superficie celular novedosa con la proteína que codifica un dominio de IgV, un dominio transmembranario y dos supuestos motivos inhibidores de la tirosina del inmunorreceptor (véase la publicación de la patente de EE.UU. N.º US20040121370). Se mostró que la proteína designada TIGIT (por la célula T-Ig y el dominio ITIM) se expresaba en las células T, particularmente en los subconjuntos de células T_{reg} y de memoria, así como en células NK. El documento WO 2006/124667 A describe anticuerpos anti-zB7R1 (TIGIT) que inhiben la proliferación de células T. Existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos y métodos de tratamiento para tratar trastornos inmunitarios, particularmente trastornos autoinmunitarios. En el presente documento, los solicitantes identifican componentes de unión a TIGIT y proporcionan nuevas composiciones, métodos de detección y métodos para el tratamiento de trastornos inmunitarios modulados por la interacción de TIGIT con aquellos componentes de unión y los efectos de TIGIT dilucidados sobre la maduración y actividad de las células T.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en métodos para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la inmunidad en mamíferos, incluyendo seres humanos como se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa en la identificación de proteínas involucradas en la regulación negativa de la proliferación y función de ciertos tipos de células inmunitarias. Las enfermedades relacionadas con la inmunidad pueden tratarse suprimiendo o potenciando la respuesta inmunitaria. Las moléculas que potencian la respuesta inmunitaria estimulan o potencian la respuesta inmunitaria a un antígeno. Las moléculas que estimulan la respuesta inmunitaria pueden usarse terapéuticamente, donde el potenciamiento de la respuesta inmunitaria sería beneficioso. Alternativamente, las moléculas que suprimen la respuesta inmunitaria atenúan o reducen la respuesta inmunitaria a un antígeno (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) pueden usarse terapéuticamente, donde la atenuación de la respuesta inmunitaria sería beneficiosa (por ejemplo, inflamación). En el presente documento, los solicitantes demuestran que la proteína TIGIT (por "célula T-Ig y dominio ITIM") se unen específicamente al receptor del virus de la poliomielitis (PVR, también conocido como CD155) y a varios otros miembros de una familia de proteínas dilucidada recientemente, y que esta interacción de TIGIT-PVR regula negativamente la activación y proliferación de células T. En consecuencia, los polipéptidos de TIGIT, agonistas de los mismos, y antagonistas de los mismos, así como los polipéptidos de PVR, agonistas de los mismos y antagonistas de los mismos, son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamatorias. La invención proporciona composiciones para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamatorias como se define en las reivindicaciones.

La invención proporciona un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo que comprende las HVR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 23-28 para su uso en un método de tratamiento según las reivindicaciones. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo para su uso en un método de tratamiento según las reivindicaciones, en la que la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo para su uso en un método de tratamiento según las reivindicaciones, en la que la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 o una porción de la misma. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo para su uso en un método de tratamiento según las reivindicaciones, en la que la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 o una porción de la misma y la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 o una porción de la misma. En un aspecto, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en un método de tratamiento según las reivindicaciones de la invención está seleccionado de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo heteroconjugado, y una inmunotoxina.

En otro aspecto, la cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21. En otro aspecto, la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22. En otro aspecto, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En otra realización, la invención proporciona dicho anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo para su uso en un método de modulación de la función y/o la actividad de células inmunitarias modulando la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR. En un aspecto, la modulación está aumentando o estimulando la proliferación de una o más células inmunitarias o la liberación de citocinas proinflamatorias por una o más células inmunitarias tratando las células *in vivo* con dicho antagonista de la actividad de TIGIT, o inhibiendo la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR.

En otra realización, la invención proporciona dicho anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo para su uso en un método de aumento o estimulación de una respuesta inmunitaria administrando *in vivo* dicho antagonista de la actividad de TIGIT, o inhibiendo la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR. En otra realización, la invención proporciona dicho anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento del mismo para su uso en un método de modulación del tipo y/o de la cantidad de producción de citocinas de una célula inmunitaria modulando la actividad de TIGIT *in vivo*. En un aspecto, la producción de citocinas proinflamatorias se estimula y/o aumenta por la administración de dicho antagonista de la actividad de TIGIT, o inhibiendo la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un alineamiento de las secuencias de la proteína TIGIT humana, de ratón, de rhesus y de perro. El sombreado indica las posiciones que contienen aminoácidos idénticos en tres o cuatro especies. La secuencia señal está indicada por una línea discontinua, el dominio fijo V de inmunoglobulina está indicado por una línea doble, los sitios de N-glucosilación están indicados por una línea delgada por encima de la posición requerida, el dominio transmembranario está indicado por una línea gruesa y el supuesto motivo ITIM extendido está indicado por una línea discontinua doble. La TIGIT humana comparte 88 %, 67 % y 58 % de identidad con las secuencias de macaco rhesus, perro y ratón, respectivamente.

Las Figuras 2A y 2B representan un alineamiento de las secuencias de la proteína de los dominios de IgV de las proteínas de la familia de PVR indicadas. Las cadenas laterales que comparten similitud a través de las secuencias se marcan según la propiedad. Se indican los restos de la huella del marco V (círculo negro) y los restos de la huella relacionados con el PVR (restos en el recuadro de línea gruesa). Para fines comparativos, también se alinean seis secuencias del dominio de IgV (expuestas bajo la línea horizontal) de los miembros de la familia que no son del PVR.

La Figura 3 representa los resultados de análisis de biosensor para evaluar la capacidad de TIGIT-Fc (línea gris claro) o una proteína Fc de control (línea negra) para unirse a varias proteínas, como se describe en el Ejemplo 2. Los números 1-8 representan, respectivamente, ESAM, OTOR, TEK, TNFRSF10C, IGFBP4, PVR, IL-19 y TEK.

La Figura 4A representa los resultados de los ensayos de biosensor para evaluar la unión de varias proteínas de fusión Fc a TIGIT-Fc inmovilizado, como se describe en el Ejemplo 2. Las Figuras 4B-1 a 4B-6 representan los resultados de análisis FACS para evaluar la unión de las proteínas de fusión Fc biotiniladas a transfectantes estables CHO que expresan el receptor, como se describe en el Ejemplo 2.

Las Figuras 5A y 5B representan los resultados de un ensayo de unión al radioligando representativo para determinar la K_d para la unión entre TIGIT-Fc y células CHO que expresan PVR, como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 6 muestra gráficas que representan los resultados de los estudios de unión de competencia entre TIGIT, PVR, CD226 y CD96, como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 7 muestra los resultados de experimentos que evalúan la capacidad de un anticuerpo anti-PVR para bloquear la unión de PVR a TIGIT o CD226, como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 7A representa la unión de PVR-Fc biotinilado a transfectantes CHO que expresan CD226 o TIGIT en presencia (línea de puntos) o ausencia (línea continua) de un exceso molar de 10 veces del anticuerpo D171. Los resultados de un anticuerpo de control del mismo isotipo se indican por el área sombreada. La Figura 7B representa la unión de PVR-Fc (línea superior) o el tampón (línea inferior) a los biosensores cargados con CD226-Fc o TIGIT-Fc. La línea media indica la unión de PVR-Fc al biosensor precargado con CD226-Fc o TIGIT-Fc que había sido bloqueado con el anticuerpo D171 antes de la exposición a PVR-Fc.

La Figura 8A representa los datos de expresión de TIGIT (panel izquierdo) o los datos de expresión de CD226 (panel derecho) en varios tipos de células inmunitarias, como se describe en el Ejemplo 2(A). La Figura 8B representa análisis de RT-PCR de TIGIT y la expresión de ARNm de ICOS en células T_H amigdalinas, como se describe en el Ejemplo 2(A).

Las Figuras 9A-B representan los resultados de experimentos que prueban la capacidad del anticuerpo anti-TIGIT 10A7 para unirse a TIGIT en la superficie de las células, como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 9A

muestra la unión del anticuerpo anti-TIGIT 10A7 a líneas celulares 293-TIGIT estables (línea continua) y la anulación de la unión en presencia de PVR-Fc (línea discontinua). La región gris representa la unión de un anticuerpo de control del mismo isotipo. La Figura 9B muestra los resultados de análisis FACS que demuestran que TIGIT se coexpresa con FoxP3 en células T CD4⁺ GITR⁺. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Las Figuras 10A-F representan los resultados de experimentos que evalúan la expresión de TIGIT ya sea mediante análisis de ARNm o mediante estudios de unión en la superficie celular, como se describe en el Ejemplo 3. Las Figuras 10A-1 a 10A-2 representan los resultados de experimentos de citometría de flujo para determinar la expresión de TIGIT y CD226 en células T CD4⁺CD45RA⁺ en reposo o activadas (durante uno o dos días) (panel izquierdo) o CD4⁺CD45RO⁺ (panel derecho), como se describe en el Ejemplo 2(A). La Figura 10B muestra una gráfica de barras que indica las veces de cambio en el ARNm de TIGIT en diferentes tipos de células inmunitarias clasificadas directamente ex vivo de las CMSP, en comparación con los niveles de ARNm de TIGIT en las células CD4⁺CD45RA⁺ intactas. La Figura 10C muestra gráficas de barras que indican las veces de aumento en los niveles de ARNm de TIGIT en células T_{reg} CD4⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RA⁺ y CD4⁺CD25^{hi} clasificadas, activadas con anti-CD3 y anti-CD28 durante 1 o 2 días, o células NK CD56⁺ clasificadas activadas con IL-2 durante un día, en comparación con las células no estimuladas. Las gráficas de FACS mostradas son de un experimento representativo y los valores de RT-PCR son un promedio de tres donantes. La Figura 10D muestra los resultados de los ensayos FACS que muestran que las células de CMSP humana CD25⁻ carecen de expresión de TIGIT. La Figura 10E representa los resultados de experimentos FACS que evalúan la expresión de la superficie celular de TIGIT en células de CMSP humana que expresan cantidades bajas o altas de CD25 y muestran que la expresión de TIGIT se correlaciona con la expresión de FOXP3. La Figura 10F representa los resultados de experimentos FACS que evalúan la expresión de TIGIT en células T CD4⁺CD25^{hi} clasificadas, activadas con anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas (panel izquierdo) y análisis de RT-PCR complementarios de niveles de ARNm de TIGIT en células C CD25⁻ o CD25^{hi} CD4⁺ en reposo o activadas.

La Figura 11 proporciona gráficas que muestran las veces de cambio en la expresión de TIGIT o CD226 en células CD25⁺, CD25⁻, CD45RA⁺, CD45RO⁺ en reposo o activadas (durante uno o dos días), como se describe en el Ejemplo 2(A).

La Figura 12A representa los resultados de experimentos de citometría de flujo para evaluar la estabilidad de la expresión de TIGIT en células T, como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 12B representa los resultados de ensayos basados en placa para evaluar la expresión de TIGIT en células TIGIT⁺ y TIGIT⁻ clasificadas, expuestas a concentraciones variables de anti-CD3, como se describe en el Ejemplo 3.

Las Figuras 13A-C muestran gráficas que representan los resultados de experimentos que evalúan la capacidad de TIGIT para modular la producción de IL-10, IL-12p40 e IL-12p70 en ratones scid que carecen de células B y T, como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 14 representa los resultados de experimentos de citometría de flujo para evaluar la expresión de TIGIT en células T auxiliares que producen IL-17 frente a que producen IL-2, como se describe en el Ejemplo 2(A). Los datos en cada panel son representativos de un experimento que usa CMSP de un donante diferente.

La Figura 15 representa los resultados de análisis de ARNm que evalúan los niveles de expresión de TIGIT en muestras de tejido enfermo, como se describe en el Ejemplo 3. El panel más a la derecha proporciona los datos de expresión de células clasificadas tomadas de tejido sinovial de artritis reumatoide. La expresión de PVR y de CD226 fue indetectable en estas muestras.

La Figura 16 representa los resultados de experimentos de RT-PCR que evalúan la expresión de TIGIT (panel superior) o CD226 (panel inferior) en tejidos tomados en varios momentos de tiempo de modelos de ratón de artritis inducida por colágeno con respecto a muestras normales.

La Figura 17 representa los resultados de análisis del ARNm que evalúan los niveles de expresión de TIGIT, PVR y CD226 en muestras de tejido de monos rhesus asmáticos y de control, como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 18A describe los resultados de análisis de ARNm que evalúan los niveles de expresión de TIGIT (panel superior) en células normales o cancerosas o la expresión de CD4 en varias muestras de tumor de mama (panel inferior). Las Figuras 18B-18D representan los resultados de análisis de ARNm que evalúan los niveles de expresión de TIGIT (Figura 18B), PVR (Figura 18C) y CD226 (Figura 18D) en varias muestras de cáncer, como se describe en el Ejemplo 3. Los paneles inferiores de cada una de las Figuras 18B, 18C y 18D muestran niveles de expresión de TIGIT, PVR o CD226, respectivamente, en muestras de cáncer que contienen varios porcentajes de células de tumor. Los recuadros en todos los paneles representan datos estadísticamente significativos.

Las Figuras 19A-D representan los resultados de experimentos que evalúan el efecto de TIGIT sobre la activación de las células T, como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 19A representa los resultados de los ensayos FACS que evalúan la expresión de PVR en monocitos CD14⁺, iMDDC y MDDC. Los experimentos anti-

PVR se muestran sin sombreado y los controles del mismo isotipo se muestran en gris. La Figura 19B representa los resultados de ensayos MLR *in vitro* usando DC maduras con TNF α y células T CD4 $^{+}$ aisladas, que evalúan el efecto de TIGIT-Fc sobre la proliferación de células T. Los datos indicados con el asterisco tienen una $p < 0,001$. La Figura 19C describe los resultados de experimentos que evalúan la proliferación de células T mediante la incorporación de [3 H]-timidina (cpm) (panel izquierdo) y la producción de IFN- γ mediante ELISA (panel derecho) en células T CD4 $^{+}$ activadas con anti-CD3 soluble en presencia de las DC CD11c $^{+}$ autólogas y el anticuerpo anti-TIGIT 10A7 (barras negras) o el control del isotipo (barras blancas). Un solo asterisco indica una $p < 0,01$; un asterisco doble indica una $p < 0,001$. La Figura 19D representa los resultados de experimentos que evalúan la proliferación y producción de IFN- γ en células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ intactas activadas con las DC CD11c $^{+}$ autólogas y anti-CD3 solubles en presencia de 100 μ g/ml de TIGIT-Fc (barras grises) o el control del isotipo (barras blancas). Un solo asterisco indica una $p < 0,01$; un asterisco doble indica una $p < 0,001$.

Las Figuras 20A y 20B representan los resultados de experimentos que evalúan la capacidad de células T de TIGIT $^{+}$ clasificadas para inhibir la proliferación de células T TIGIT $^{+}$ en un ensayo MLR, como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 21A representa los resultados de ensayos de proliferación que evalúan el efecto de células T $_{reg}$ TIGIT $^{+}$ sobre la proliferación de otras células T y APC en presencia y ausencia del anticuerpo anti-TIGIT (10A7), como se describe en el Ejemplo 4, así como la producción de IFN γ e IL-10 en esas poblaciones celulares. La Figura 21B representa los resultados de ensayos de proliferación que evalúan el efecto de células T $_{reg}$ TIGIT $^{+}$ sobre la proliferación de células T intactas en comparación con T $_{reg}$ TIGIT $^{+}$, como se describe en el Ejemplo 4A.

Las Figuras 22A-D representan los resultados de experimentos que evalúan la capacidad de TIGIT para modular la producción de citocinas en iMDDC y DC maduras, como se describe en el Ejemplo 5. Las Figuras 22A-1 a 22A-3 muestran los resultados de ensayos de ELISA que miden la producción de IL-10 o IL-12p40 en iMDDC, iMDDC estimuladas con TNF α , iMDDC estimuladas con CD40L, iMDDC estimuladas con LPS, o iMDDC estimuladas con Pam3CSK4. Los resultados mostrados son promedios de tres experimentos. Las líneas en cada panel representan los datos de cada uno de tres donantes diferentes. La Figura 22B muestra los resultados de análisis FACS para medir la expresión de los marcadores de la maduración de la superficie celular HLA-DR, CD80, CD83 y CD86 en las células tratadas. Los valores se representan como la intensidad de la fluorescencia media (MFI), y los datos mostrados son representativos de tres donantes. La Figura 22C muestra los datos de los experimentos que miden los efectos de TIGIT sobre la producción de otras citocinas proinflamatorias de MDDC maduras con TNF α o maduras con LPS. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos. Los niveles de IL-6, IL12p70 e IL-18 se determinaron mediante análisis LUMINEX, como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 22D muestra una gráfica que representa las cantidades relativas de secreción de TGF β en iMDDC, en respuesta a TIGIT.Fc o a un control del mismo isotipo, como se describe en el Ejemplo 5.

Las Figuras 23A-C representan los resultados de experimentos que evalúan el efecto del tratamiento con TIGIT sobre la activación de la señalización en la dirección 3' mediante PVR, como se describe en el Ejemplo 6. La Figura 23A muestra los análisis de transferencia Western del estado de fosforilación de la tirosina de PVR tratado con TIGIT o un control. La Figura 23B muestra los análisis de transferencia Western del estado de dimerización de ERK tras el tratamiento de iMDDC con TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, o el control. La Figura 23C muestra los análisis de transferencia Western de β -catenina activa frente a la total en iMDDC tratadas con TIGIT frente a tratadas con el control.

Las Figuras 24A-B representan los resultados de experimentos que evalúan el efecto del bloqueo de varias moléculas de señalización en la dirección 3' sobre las disminuciones inducidas por TIGIT en la producción de IL-12p40 en MDDC maduras con TNF α , como se describe en el Ejemplo 6. La Figura 24A muestra gráficas de los resultados de experimentos que prueban el impacto de un inhibidor de la cinasa MAPK sobre las disminuciones inducidas por TIGIT-Fc o TIGIT-Fc-DANA sobre la producción de IL-12p40. La Figura 24B muestra gráficas de los resultados de experimentos que evalúan el impacto de un anticuerpo anti-TIGIT (10A7), un anticuerpo anti-IL-10, o un anticuerpo anti-CD32 en las disminuciones mediadas por TIGIT en la producción de IL-12p40 de MDDC maduras con TNF α .

Las Figuras 25A-B representan los resultados de experimentos que evalúan el impacto del tratamiento con TIGIT-Fc sobre la activación de células T, como se describe en el Ejemplo 7. Las gráficas de datos de experimentos que evalúan la cantidad de proliferación de células T (Figura 25A) o la producción de IL-2 (Figura 25B) inducida por/en iMDDC o cultivos de MDDC maduros con TNF α /CD40L tratadas con o anticuerpo de control.

La Figura 26 representa los resultados de experimentos que evalúan el impacto del tratamiento con TIGIT-Fc en la expresión de ILT en MDDC humanas activadas, como se describe en el Ejemplo 7.

Las Figuras 27A-H representan los resultados de experimentos que evalúan el efecto del tratamiento con TIGIT sobre las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado en ratones, como se describe en el Ejemplo 7. La

Figura 27A muestra una gráfica que representa los datos de la hinchazón de la oreja de ratones no mutantes o inactivados en IL-10, tratados con el anticuerpo anti-ambrosía, TIGIT-Fc o CTLA4. La Figura 27B muestra los datos que representan la respuesta de proliferación de células del bazo de ratones tratados con TIGIT-Fc, CTLA4-Fc o de control a la reestimulación con KLH. Los datos se muestran como respuesta $\pm$ desviación estándar ($n=3$ por grupo; el ensayo de recuperación *in vitro* se realizó en pocillos por triplicado). La Figura 27C muestra una gráfica que representa los datos de la hinchazón de la oreja de ratones no mutantes tratados con TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA o anticuerpo anti-TIGIT 10A7. Las Figuras 27D y 27E representan gráficas que indican la respuesta de proliferación de las células del bazo de ratones no mutantes (Figura 27D) o inactivados en IL-10 (Figura 27E) tratados con TIGIT-Fc a la reestimulación con KLH. Las Figuras 27F y 27G representan gráficas que indican los niveles de IL-2 o IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos aislados de ratones no mutantes (Figura 27F) o inactivados en IL-10 (Figura 27G) tratados con TIGIT-Fc que habían sido reactivados con KLH durante dos días. Los datos se muestran como media $\pm$ d.e. ($n=3$ por grupo; la recuperación *in vitro* se realizó en pocillos por triplicado). Un asterisco indica $p<0,001$. La Figura 27H representa gráficas que muestran los niveles relativos de ARNm de IL-10 (panel izquierdo), IL-12/23p40 (panel central) e IL-12p35 (panel derecho) de esplenocitos CD11c⁺ de ratones no mutantes o deficientes en IL-10 tratados con TIGIT-Fc y el control del isotipo, como se ha determinado mediante qRT-PCR ($n=8$). Los niveles de ARNm de IL-10 de los esplenocitos agotados en WT CD11c⁻ también se determinaron como control. Los datos representan niveles de ARNm arbitrarios con respecto a niveles de ARNm correspondientes de ratones no inmunizados. Un asterisco indica $p<0,05$.

Las Figuras 28A-28E representan los resultados de experimentos que evalúan los efectos de la inactivación de la expresión de TIGIT mediante ARNip específico de TIGIT, como se describe en el Ejemplo 4(B). La Figura 28A muestra los resultados de análisis de qRT-PCR de la eficiencia de inactivación de TIGIT frente al ARNip de control. Los niveles de ARNm de CTLA4 se determinaron como un control no diana. La Figura 28B muestra los análisis FACS de la expresión de TIGIT en la superficie en células tratadas con ARNip_{control} y ARNip_{TIGIT} (resumidas en la Tabla 7). Las Figuras 28C y 28D muestran los resultados de análisis FACS de la proliferación celular de células T humanas CD4⁺CD45RO⁺ activadas con anti-CD3 unido a placa solo o conjuntamente con anti-CD28 en presencia del ARNip_{control} o ARNip_{TIGIT} (Figura 27C) o el anticuerpo anti-TIGIT 10A7 (Figura 27D). La Figura 28E representa los resultados de análisis de la producción de citocinas de las células usadas en los ensayos en la Figura 28C después de dos días de cultivo. Los datos mostrados son representativos de cuatro donantes y experimentos individuales.

Las Figuras 29A-29E representan los resultados de experimentos que evalúan la expresión de CD226 en varios tipos de células y tras varios tratamientos. La Figura 29A representa los resultados de análisis FACS que muestran la expresión superficial de CD226 en células CD4⁺CD45RA⁺ intactas clasificadas en reposo y activadas con anti-CD3 y anti-CD28 (día 1 y 2) (paneles superiores) o células CD4⁺CD45RO⁺ de memoria (paneles inferiores) usando anti-CD226. La Figura 29B proporciona gráficas que muestran las veces de aumento en los niveles de ARNm en células CD4⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RA⁺ y CD8⁺ clasificadas, activadas con anti-CD3 más anti-CD28 durante 1 o 2 días, y células NK CD56⁺ clasificadas activadas con IL-2 más IL-15 durante un día, en comparación con células no estimuladas. La Figura 29C muestra los niveles de ARNm relativos de varios marcadores celulares en las células clasificadas directamente *ex vivo* de las CMSP como se ha determinado mediante qRT-PCR, como un indicador de las poblaciones de células CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD25^{hi}T_{reg}, NK y DC CD11c⁺ con respecto a las células CD4⁺CD45RA⁺ intactas. Los datos mostrados representan un promedio de los datos de tres donantes. La Figura 29D representa los resultados de análisis FACS para determinar la coexpresión de CD226 y CD25 en células CD4⁺ activadas, tomadas de una población de CMSP humanas totales teñidas con anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD226. La gráfica mostrada es una representativa de dos donantes. La Figura 29E muestra una gráfica que representa los niveles de ARNm de TIGIT y CD226 en células CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25^{hi} activadas y en reposo aisladas de CMSP. Los niveles de ARNm se representan como las veces de cambio con respecto a las células CD4⁺CD25⁻ en reposo y son un promedio de los datos de dos donantes.

Las Figuras 30A-C representan los resultados de experimentos que evalúan la funcionalidad de las células inmunitarias en ratones deficientes de TIGIT, como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 30A muestra gráficas que comparan la proliferación de células T deficientes de TIGIT (TIGIT.KO) frente a células T no mutantes en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel medio) de células presentadoras de antígenos no mutantes. El panel derecho muestra gráficas que comparan la proliferación de células T TIGIT.KO a las células T no mutantes en presencia de células presentadoras de antígenos de TIGIT.KO. La Figura 30B muestra los resultados de ensayos FACS que evalúan los niveles de IFN γ e IL-4 en células T TIGIT.KO frente a no mutantes. La Figura 30C son gráficas que muestran los niveles medidos de las citocinas indicadas en los sobrenadantes de células T TIGIT.KO o no mutantes.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

TIGIT se había identificado previamente como un supuesto modulador de la función inmunitaria (véase, por ejemplo, la publicación de la patente de EE.UU. N.º US20040121370). En el presente documento, los solicitantes demuestran que TIGIT es un miembro de una familia descrita recientemente de proteínas relacionadas con la inmunidad, que

incluye el receptor del virus de la poliomielitis (PVR, también conocido como NECL5 o CD155), proteínas 1-4 similares al PVR (PVRL1-4), CD96 y CD226. Los solicitantes desvelan los elementos estructurales conservados de esta nueva familia, cuyos miembros desempeñan funciones en la regulación y función inmunitaria, y desvelan métodos de identificación de miembros adicionales de la familia.

Los solicitantes muestran que TIGIT se une estrechamente al PVR, y se une con una Kd menor a PVRL3 (también conocido como nectina-3 o CD113) y PVRL2 (también conocido como nectina-2 o CD112). El PVR es un receptor de la superficie celular altamente expresado en células dendríticas (DC), así como FDC, fibroblastos, células endoteliales y algunas células del tumor (Sakisaka, T. & Takai, Y., *Curr Opin Cell Biol* 16, 513-21 (2004); Fuchs, A. & Colonna, M., *Semin Cancer Biol* 16, 359-66 (2006)). Los solicitantes muestran mediante análisis de ARNm y FACS que TIGIT se expresa predominantemente en varias células T activadas, particularmente células T reguladoras (T_{reg}), células T de memoria, células NK y células T auxiliares foliculares (T_{fh}). Los estudios descritos en el presente documento demuestran la interacción de TIGIT con PVR en DC, y muestran que esta interacción de unión modula la función de DC, particularmente la producción de citocinas. Las DC humanas unidas a TIGIT secretan altos niveles de IL-10 y menos citocinas proinflamatorias (tales como IL-12p40 e IL-12p70). La unión de TIGIT a células T inmaduras (como se evalúa usando construcciones de fusión de TIGIT), inhibió la activación y proliferación de células T. En particular, esta inhibición se invirtió en presencia de un inhibidor de ERK, indicando que la activación de ERK puede ser una etapa importante en el funcionamiento de TIGIT para modular la actividad de DC. Los solicitantes muestran en el presente documento que las células T TIGIT⁺ suprimen la proliferación de no solo otras células T TIGIT⁺, sino también las células presentadoras de antígenos, cuando están presentes en una población mixta de células inmunitarias, y que la TIGIT misma es responsable de este efecto supresor, ya que la inclusión de un anticuerpo anti-TIGIT de bloqueo en la mezcla reduce en gran medida la supresión observada.

TIGIT aumenta en la expresión en tejidos de artritis, psoriasis, trastorno inflamatorio del intestino y de cáncer de mama con respecto a los tejidos de control normales, como se muestra en el presente documento. Los solicitantes también demuestran directamente la capacidad de TIGIT para modular la respuesta inmunitaria mostrando que una proteína de fusión de TIGIT inhibió las respuestas de las células T humanas *in vitro* y la activación de las células T murinas en un ensayo de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*. TIGIT modificó significativamente DC maduras, y a un menor grado, DC inmaduras, sugiriendo que la interacción TIGIT-PVR puede ser importante en el ajuste de una respuesta inmunitaria reguladora una vez que las DC se vuelven células presentadoras de antígenos completamente activadas. Los experimentos presentados en el presente documento sugieren un mecanismo mediante el cual la TIGIT inhibe la activación de células T a través de un bucle de retroalimentación inhibitorio mediante la inducción de IL-10 en DC. Por consiguiente, la divulgación proporciona además novedosos métodos de modulación de la función inmunitaria, modulando los subconjuntos particulares de citocinas o los subconjuntos particulares de células inmunitarias. Estos y otros aspectos de la invención se describen en mayor detalle en el presente documento posteriormente.

I. Definiciones

Los términos "polipéptido de TIGIT", "proteína TIGIT" y "TIGIT" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a secuencias de polipéptidos específicas como se describe en el presente documento. Los polipéptidos de TIGIT descritos en el presente documento pueden aislarse de varias fuentes, tales como de tejido humano o tejido de un organismo no humano, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. En una realización, un polipéptido de TIGIT tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4. Todas las divulgaciones en esta memoria descriptiva que se refieren al "polipéptido de TIGIT" se refieren a cada uno de los polipéptidos individuales, así como en conjunto. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, purificación de, derivación de, formación de anticuerpos para o contra, la administración de, composiciones que contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polipéptido de la invención individualmente. Los términos "polipéptido de TIGIT", "proteína TIGIT" o "TIGIT" también incluyen variantes de los polipéptidos de TIGIT desvelados en la presente o conocidos en la técnica.

Una "polipéptido de TIGIT de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de TIGIT correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos de TIGIT de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido de TIGIT de secuencia nativa" engloba específicamente las formas truncadas o secretadas que existen de forma natural del polipéptido de TIGIT específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), las formas variantes que existen de forma natural (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y las variantes alélicas que existen de forma natural del polipéptido. En varias realizaciones de la invención, los polipéptidos de TIGIT de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de la secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa. Sin embargo, aunque el polipéptido de TIGIT desvelado en las figuras adjuntas se muestra como que empieza con restos de metionina designados en la presente como la posición 1 del aminoácido en las figuras, es concebible y posible que otros restos de metionina localizados o bien en la dirección 5' o bien en la dirección 3' de la posición 1 del aminoácido en las figuras puedan emplearse como el resto de aminoácido inicial para los polipéptidos de TIGIT.

El "dominio extracelular" del polipéptido de TIGIT o "ECD" se refiere a una forma del polipéptido de TIGIT que está

esencialmente libre de los dominios transmembranarios y citoplasmáticos. Generalmente, un ECD del polipéptido de TIGIT tendrá menos del 1 % de tales dominios transmembranarios y/o citoplasmáticos, y preferentemente, tendrá menos del 0,5 % de tales dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembranario identificado para los polipéptidos de TIGIT de la presente invención se identifican según el criterio rutinariamente empleado en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembranario pueden variar, pero más probablemente, no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se identifica en el presente documento. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido de TIGIT puede contener de aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier lado del límite del dominio transmembranario/dominio extracelular, y tales polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifican, están contemplados por la presente invención. En una realización, el ECD de TIGIT engloba los aminoácidos 1-139 de la proteína TIGIT humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.

Las localizaciones aproximadas de los "péptidos señal" de los varios polipéptidos de TIGIT desvelados en el presente documento pueden identificarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia señal del polipéptido de TIGIT humano expuesto en SEQ ID NO: 1 se predice que engloba los aminoácidos 1-15 (véase, por ejemplo, la publicación de la patente de EE.UU. N.º US20040121370). Se indica, sin embargo, que el límite del extremo C de un péptido señal puede variar, pero más probablemente no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite del extremo C del péptido señal, como se identificó inicialmente en el presente documento, en el que el límite del extremo C del péptido señal puede identificarse según criterios rutinariamente empleados en la técnica para identificar ese tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es enteramente uniforme, resultando en más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido señal se escinde dentro de no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite del extremo C del péptido señal como se identifica en el presente documento, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

"Variante del polipéptido de TIGIT" significa un polipéptido de TIGIT activo como se definió anteriormente, o a continuación, que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con una secuencia del polipéptido de TIGIT de secuencia nativa de longitud completa como se desveló en el presente documento, una secuencia del polipéptido de TIGIT que carece del péptido señal como se desveló en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido de TIGIT, con o sin el péptido señal, como se desveló en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido de TIGIT de longitud completa. Tales variantes del polipéptido de TIGIT incluyen, por ejemplo, polipéptidos de TIGIT en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden, o delecionan, en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa.

Generalmente, una variante del polipéptido de TIGIT tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y alternativamente al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia del polipéptido de TIGIT de secuencia nativa de longitud completa como se desveló en el presente documento, a una secuencia del polipéptido de TIGIT que carece del péptido señal como se desveló en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido de TIGIT, con o sin el péptido señal, como se desveló en el presente documento o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia del polipéptido de TIGIT de longitud completa. Generalmente, los polipéptidos variantes de TIGIT son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 100

aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

- 5 "Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptidos de TIGIT identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de TIGIT específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencias. El
- 10 alineamiento con el fin de determinar la identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en el presente documento, los valores de identidad de secuencias de aminoácidos en % se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 está públicamente disponible. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en la que está
- 15 registrado con el N.º de acceso de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible por Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.
- 20
- 25 En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y

- en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos B con respecto a A. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencias de aminoácidos usando este método, las Tablas 1 y 2 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada "Proteína de comparación" con
- 35 la secuencia de aminoácidos designada "TIGIT", en la que "TIGIT" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de TIGIT hipotético de interés, "Proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que se compara el polipéptido de "TIGIT" de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno restos de aminoácidos hipotéticos diferentes.
- 40

- 45
- | | | |
|-------------------------|-------------------|-----------------------------|
| | Tabla 1 | |
| Proteína de interés | XXXXXXXXXXXXXXXXX | (Longitud = 15 aminoácidos) |
| Proteína de comparación | XXXXXXXXXXXXYYY | (Longitud = 12 aminoácidos) |

% de identidad de la secuencia de aminoácidos =

- (el número de restos de aminoácidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos de la proteína de interés) = 5 dividido entre 15 = 33,3 %
- 50

Tabla 2		
Proteína de interés	XXXXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de la secuencia de aminoácidos =

- 55 (el número de restos de aminoácidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos de la proteína de interés) = 5 dividido entre 10 = 50 %

- A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores del % de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente precedente y las Tablas 1 y 2 usando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores del % de identidad de la secuencia de aminoácidos también pueden obtenerse como se describe a continuación usando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los
- 60

parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se establecen a los valores por defecto. Aquellos no establecidos a los valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se establecen con los siguientes valores: distancia de superposición=1, fracción de superposición=0,125, umbral de la palabra (T) = 11 y matriz de puntuación=BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor del % de identidad de la secuencia de aminoácidos dividiendo (a) el número de restos de aminoácidos idénticos correspondientes entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de TIGIT de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido de TIGIT nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la cual el polipéptido de TIGIT de interés se compara, que puede ser un polipéptido variante de TIGIT) como se ha determinado mediante WU-BLAST-2 entre (b) el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de TIGIT de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene o que tiene al menos el 80 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de TIGIT de interés.

El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos también puede determinarse usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de otro modo del Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos de aquellos parámetros de búsqueda están establecidos a los valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, no enmascarado = sí, hebra = todas, casos esperados = 10, longitud de la complejidad baja mínima = 15/5, valor e de múltiples pasos = 0,01, constante para los múltiples pasos = 25, disminución para el alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación=BLOSUM62.

En situaciones donde NCBI-BLAST2 se emplea para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada), se calcula del siguiente modo:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como correspondencias idénticas mediante el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en ese alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

Los términos “polinucleótido de TIGIT” y “secuencia de nucleótidos de TIGIT” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a secuencias de polinucleótidos específicas que codifican un polipéptido de TIGIT. Estos polinucleótidos pueden comprender ADN o ARN o ambos de ADN y ARN. Los polinucleótidos de TIGIT descritos en el presente documento pueden aislarse de varias fuentes, tales como de tejido humano o tejido de un organismo no humano, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. Todas las divulgaciones en esta memoria descriptiva que se refieren a un “polinucleótido de TIGIT” se refieren a cada uno de los polinucleótidos individuales, así como en conjunto. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, purificación de, derivación de, administración de, composiciones que contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polinucleótido de la invención individualmente, así como conjuntamente. Los términos “polinucleótido de TIGIT” y “secuencia de nucleótidos de TIGIT” también incluyen variantes de los polinucleótidos de TIGIT desvelados en el presente documento.

Un “polinucleótido de TIGIT de secuencia nativa” comprende un polinucleótido que tiene la misma secuencia de ácidos nucleicos que el polinucleótido de TIGIT correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polinucleótidos de TIGIT de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término “polinucleótido de TIGIT de secuencia nativa” engloba específicamente polinucleótidos que codifican formas truncadas o secretadas que existen de forma natural del polipéptido de TIGIT específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), las formas variantes que existen de forma natural (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que existen de forma natural del polipéptido. En varias realizaciones de la invención, los polinucleótidos de TIGIT de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polinucleótidos de la secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos de longitud completa.

Un “polinucleótido variante de TIGIT” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de TIGIT” significa una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de TIGIT activo como se define a continuación, y que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia del polipéptido de TIGIT de la secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia del polipéptido de TIGIT de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido de

TIGIT, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido de TIGIT de longitud completa. Generalmente, un polinucleótido variante de TIGIT tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente 81 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 82 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 83 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 84 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 85 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 86 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 87 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 88 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 89 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 90 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 91 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 92 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 93 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 94 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 96 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 97 % de identidad de la secuencia del ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente el 98 % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos y alternativamente al menos aproximadamente el 99 % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia del polipéptido de TIGIT de secuencia nativa de longitud completa, una secuencia del polipéptido de TIGIT de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido de TIGIT, con o sin la secuencia señal, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido de TIGIT de longitud completa. Las variantes no engloban la secuencia de nucleótidos nativa.

Generalmente, los polinucleótidos variantes de TIGIT son de al menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 3 00 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencias de ácidos nucleicos" con respecto a secuencias de ácidos nucleicos que codifican TIGIT identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de TIGIT de interés, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en la que está registrado con el N.º de acceso de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible por Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente públicamente disponible. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos C dada para, con o contra una secuencia de ácidos nucleicos D dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de ácidos nucleicos C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos para, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos D dada) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción W/Z

en la que W es el número de nucleótidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de D con respecto a C. Como ejemplos de cálculos

del % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, las Tablas 3 y 4 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos designada "ADN de comparación" con la secuencia de ácidos nucleicos designada "ADN de TIGIT", en la que "ADN de TIGIT" representa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica TIGIT hipotético de interés, "ADN de comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que está siendo comparada la molécula de ácido nucleico de "ADN de TIGIT" de interés, y "N", "L" y "V" representan cada uno nucleótidos hipotéticos diferentes. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

Tabla 3

ADN de interés	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina mediante ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos del ADN de interés) = 6 dividido entre 14 = 42,9 %

Tabla 4

ADN de interés	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina mediante ALIGN-2) dividida entre (el número total de nucleótidos del ADN de interés) = 4 dividido entre 12 = 33,3 %.

A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores del % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos usados en el presente documento se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente precedente y las Tablas 3 y 4 usando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores del % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos pueden obtenerse como se describe a continuación usando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 están establecidos a los valores por defecto. Aquellos que no se establecen a los valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, están establecidos con los siguientes valores: distancia de superposición=1, fracción de superposición=0,125, umbral de la palabra (T) = 11 y matriz de puntuación=BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor del % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos correspondientes entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de TIGIT de interés que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido de TIGIT de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la cual la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de TIGIT de interés se compara, que puede ser un polinucleótido de TIGIT variante) como se ha determinado mediante WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de TIGIT de interés. Por ejemplo, en la afirmación "una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos A que tiene o que tiene al menos el 80 % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos B", la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácidos nucleicos de comparación de interés, y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de TIGIT de interés.

El porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos también puede determinarse usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de otro modo del Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD. El NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos de aquellos parámetros de búsqueda están establecidos a los valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, no enmascarado = sí, hebra = todos, casos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor e de múltiples pasos = 0,01, constante para los múltiples pasos = 25, disminución para la alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación=BLOSUM62.

En situaciones donde NCBI-BLAST2 se emplea para comparaciones de secuencias, el % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos C dada para, con o contra una secuencia de ácidos nucleicos D dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos para, con o contra una secuencia de ácidos nucleicos D dada), se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción W/Z

donde W es el número de nucleótidos puntuado como correspondencias idénticas mediante el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en ese alineamiento del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de D a C.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de TIGIT son moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de TIGIT activo y que son capaces de hibridarse, preferentemente bajo condiciones rigurosas de hibridación y lavado, con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de TIGIT de longitud completa, como se desveló en el presente documento. Los polipéptidos variantes de TIGIT pueden ser aquellos que están codificados por un polinucleótido variante de TIGIT.

“Aislado”, cuando se usa para describir los diversos polipéptidos de TIGIT desvelados en el presente documento, significa polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o internos usando un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido TAT no estará presente. Generalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de TIGIT “aislado” u otro ácido nucleico que codifica polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está generalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica polipéptido. Una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislado es distinta en la forma o entorno en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptido aislado se distinguen de la molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido específico ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislado incluye moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptido contenidas en células que generalmente expresan el polipéptido en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, una secuencia promotora, opcionalmente una operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está “operativamente unido” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TIGIT únicos o anticuerpos que se unen específicamente a cualesquiera de los otros polipéptidos descritos en el presente documento (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones anti-TIGIT o de anticuerpo con especificidad polipeptídica, anticuerpos anti-TIGIT de una sola cadena u otros anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos anti-TIGIT u otros anticuerpos (véase a continuación). El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

La “rigurosidad” de reacciones de hibridación puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sales. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para la hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para la re-hibridación cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, de

esto resulta que temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores menos. Para detalles adicionales y la explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se define en el presente documento, pueden identificarse por aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante tal como formamida, por ejemplo, 50 % (vol/vol) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; (3) emplear formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y 50 % de formamida a 55 °C, seguido por un lavado de alta rigurosidad de 10 minutos que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

“Condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse como se describe por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante la noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida al 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de sonda y similares.

El término “epítipo marcado” cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de interés (como un ejemplo no limitante, un polipéptido de TIGIT) fusionado a un “polipéptido de marca”. El polipéptido de marca tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de forma que no interfiere con la actividad del polipéptido con el que está fusionado. El polipéptido de marca también es casi preferentemente único, de manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítopes. Los polipéptidos de marca adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

Como se usa en el presente documento, el término “inmuno adhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

“Activo” o “actividad” para los fines en el presente documento se refiere a forma(s) de un polipéptido (como un ejemplo no limitante, un polipéptido de TIGIT) que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de una forma nativa o que existe de forma natural de ese polipéptido (en el ejemplo previo, una actividad de TIGIT), en el que actividad “biológica” se refiere a una función biológica (tanto inhibidora como estimulante) producida por un polipéptido nativo o que existe de forma natural distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido nativo o que existe de forma natural, y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido nativo o que existe de forma natural (en el ejemplo previo, un epítipo antigénico de TIGIT).

El término “aptámero” se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de unirse a una molécula diana, tal como un polipéptido. Por ejemplo, un aptámero de la invención puede unirse específicamente a un polipéptido de TIGIT, o a una molécula en una vía de señalización que modula la expresión de TIGIT. La generación y el uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.475.096, y la eficacia terapéutica de Macugen® (Eyetechn, New York) para tratar degeneración macular senil.

El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo desvelado en el presente documento. De un modo similar, el término “agonista” se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido nativo desvelado en el presente documento. Moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de

anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Métodos de identificación de agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido.

Los términos “antagonista de TIGIT” y “antagonistas de la actividad de TIGIT o expresión de TIGIT” se usan indistintamente y se refieren a un compuesto que interfiere con el funcionamiento normal de TIGIT, ya sea disminuyendo la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica TIGIT, o inhibiendo o bloqueando la actividad del polipéptido de TIGIT, o ambos. Ejemplos de antagonistas de TIGIT incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos antisentido, ARN interferentes, ARN catalíticos, quimeras de ARN-ADN, aptámeros específicos de TIGIT, anticuerpos anti-TIGIT, fragmentos que se unen a TIGIT de anticuerpos anti-TIGIT, moléculas pequeñas que se unen a TIGIT, péptidos que se unen a TIGIT, y otros polipéptidos que se unen específicamente a TIGIT (que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que se unen a TIGIT de uno o más ligandos de TIGIT, fusionados opcionalmente con uno o más dominios adicionales), de forma que la interacción entre el antagonista de TIGIT y TIGIT produzca una reducción o cese de la actividad o expresión de TIGIT. Se entenderá por un experto habitual en la materia que, en algunos casos, un antagonista de TIGIT puede antagonizar una actividad de TIGIT sin afectar otra actividad de TIGIT. Por ejemplo, un antagonista de TIGIT deseable para su uso en ciertos métodos en el presente documento es un antagonista de TIGIT que antagoniza la actividad de TIGIT en respuesta a una de la interacción de PVR, interacción de PVRL3, o interacción de PVRL2, por ejemplo, sin afectar o afectando mínimamente cualquiera de otras interacciones de TIGIT.

Los términos “antagonista de PVR” y “antagonista de la actividad de PVR o expresión de PVR” se usan indistintamente y se refieren a un compuesto que interfiere con el funcionamiento normal del PVR, ya sea disminuyendo la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica el PVR, o inhibiendo o bloqueando la actividad del polipéptido de PVR, o ambos. Ejemplos de antagonistas de PVR incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos antisentido, ARN interferentes, ARN catalíticos, quimeras de ARN-ADN, aptámeros específicos de PVR, anticuerpos anti-PVR, fragmentos que se unen a PVR de anticuerpos anti-PVR, moléculas pequeñas que se unen a PVR, péptidos que se unen a PVR, y otros polipéptidos que se unen específicamente a PVR (que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que se unen a PVR de uno o más ligandos de PVR, fusionados opcionalmente con uno o más dominios adicionales), de forma que la interacción entre el antagonista de PVR y el PVR produzca una reducción o cese de la actividad o expresión de PVR. Se entenderá por un experto habitual en la materia que, en algunos casos, un antagonista de PVR puede antagonizar una actividad de PVR sin afectar otra actividad de PVR. Por ejemplo, un antagonista de PVR deseable para su uso en ciertos métodos en el presente documento es un antagonista de PVR que antagoniza la actividad de PVR en respuesta a una interacción de TIGIT sin tener un impacto en las interacciones PVR-CD96 y/o PVR-CD226.

Los términos “agonista de TIGIT” y “agonista de la actividad de TIGIT o expresión de TIGIT” se usan indistintamente y se refieren a un compuesto que potencia o estimula el funcionamiento normal de TIGIT, aumentando la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica TIGIT, y/o inhibiendo o bloqueando la actividad de una molécula que inhibe la expresión de TIGIT o actividad de TIGIT, y/o potenciando la actividad de TIGIT normal (que incluye, pero no se limitan a, potenciar la estabilidad de TIGIT o potenciar la unión de TIGIT a uno o más ligandos diana). Por ejemplo, el agonista de TIGIT puede seleccionarse de un anticuerpo, un fragmento que se une al antígeno, un aptámero, un ARN interferente, una molécula pequeña, un péptido, una molécula antisentido y otro polipéptido de unión. En otro ejemplo, el agonista de TIGIT puede ser un polinucleótido seleccionado de un aptámero, ARN interferente o molécula antisentido que interfiere con la transcripción y/o traducción de una molécula inhibidora de TIGIT. Se entenderá por un experto habitual en la materia que, en algunos casos, un agonista de TIGIT puede agonizar una actividad de TIGIT sin afectar otra actividad de TIGIT. Por ejemplo, un agonista de TIGIT deseable para su uso en ciertos de los métodos en el presente documento es un agonista de TIGIT que agoniza la actividad de TIGIT en respuesta a una de la interacción de PVR, interacción de PVRL3 o interacción de PVRL2, por ejemplo, sin afectar o afectando mínimamente cualquiera de las otras interacciones de TIGIT.

Los términos “agonista de PVR” y “agonista de la actividad de PVR o expresión de PVR” se usan indistintamente y se refieren a un compuesto que potencia o estimula el funcionamiento normal de PVR, aumentando la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica PVR, y/o inhibiendo o bloqueando la actividad de una molécula que inhibe la expresión de PVR o la actividad de PVR, y/o potenciando la actividad de PVR normal (que incluye, pero no se limitan a, potenciar la estabilidad de PVR o potenciar la unión de PVR a uno o más ligandos diana). Por ejemplo, el agonista de PVR puede seleccionarse de un anticuerpo, un fragmento que se une al antígeno, un aptámero, un ARN interferente, una molécula pequeña, un péptido, una molécula antisentido y otro polipéptido de unión. En otro ejemplo, el agonista de PVR puede ser un polinucleótido seleccionado de un aptámero, un ARN interferente, o molécula antisentido que interfiere con la transcripción y/o traducción de una molécula inhibidora de PVR. Se entenderá por un experto habitual en la materia que, en algunos casos, un agonista de PVR puede agonizar una actividad de PVR sin afectar otra actividad de PVR. Por ejemplo, un agonista de PVR deseable para su uso en ciertos métodos en el presente documento es un agonista de PVR que agoniza la actividad de PVR en respuesta a la interacción de TIGIT, o que imita a TIGIT en la interacción con PVR, por ejemplo, sin afectar o afectando mínimamente las interacciones de unión de PVR-CD96 o PVR-CD226.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico elegido como diana. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, además de aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los cuales va a prevenirse el trastorno.

5 Administración "crónica" se refiere a la administración del (de los) agente(s) en un modo continuo a diferencia de un modo de dosis únicas, de manera que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

10 "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deporte o mascotas tales como perros, gatos, reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es el ser humano.

15 Administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

"Vehículos" como se usa en el presente documento incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada acuosa a pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

30 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diácuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

35 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía puede reticular antígeno.

40 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión por antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

50 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de los fragmentos Fab' mediante la adición de algunos restos en el extremo carboxi del dominio C_{H1} de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el (los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos

55 químicos de fragmentos de anticuerpos. Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

60 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

65 Los fragmentos de anticuerpos "Fv de una sola cadena" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en

los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permiten que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H-V_L). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo, como se ha determinado mediante el método de Lowry, y lo más preferentemente más de 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras, usando un colorante o tinción tal como, pero no se limita a, azul de Coomassie o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido o un epítopo particular en un polipéptido particular, es uno que se une a ese polipéptido o epítopo particular en un polipéptido particular, sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítopo del polipéptido.

El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo, que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en V_H (H1, H2, H3), y tres en V_L (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña una función única en conferir una especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido que existen de forma natural que consisten de una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Varias delineaciones de la HVR están en uso y están englobadas en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el programa de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender “HVR extendidas” como sigue 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en V_L y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en V_H. Los restos del dominio variable están numerados según Kabat et al., arriba, para cada una de estas definiciones.

Los restos de la “región estructural” o “FR” son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la HVR como define en el presente documento.

El término “numeración de restos del dominio variable como en Kabat” o “numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat”, y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la recopilación de los anticuerpos en Kabat et al., arriba. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después del resto 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante el alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “estándar”.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de enumeración de EU” o “índice EU” se usa generalmente cuando se refiere a un resto en una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado en Kabat et al., arriba). El “índice EU como en Kabat”, se refiere a la numeración del resto del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se establezca de otro modo en el presente documento, las referencias a los números de resto en el dominio variable de los anticuerpos significa la numeración de restos mediante el sistema de numeración de Kabat. A menos que se establezca de otro modo en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración del resto mediante el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la solicitud provisional de EE.UU. N.º 60/640.323, Figuras para la numeración EU).

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo, que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esa(s) alteración (alteraciones). En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de HVR y/o restos de la región estructural se describen por, por ejemplo, Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un “anticuerpo agonista”, como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que limita parcialmente o completamente al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

La palabra “marca”, cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con un anticuerpo para generar un anticuerpo “marcado”. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Por “fase sólida” se indica una matriz no acuosa a la cual el anticuerpo de la presente invención puede adherirse. Ejemplos de fases sólidas englobadas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aquellas formadas parcialmente o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. N.º 4.275.149.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido descrito en el presente documento o anticuerpo para el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Una “molécula pequeña” se define en el presente documento por tener un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Daltons.

El término “enfermedad relacionada con la inmunidad” significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmune de un mamífero causa, media en o contribuye de otro modo a una morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la estimulación o intervención de la respuesta inmunitaria tiene un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Incluidas dentro de este término están enfermedades

inflamatorias mediadas por la inmunidad, enfermedades inflamatorias no mediadas por la inmunidad, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

El término "enfermedad mediada por células T" significa una enfermedad relacionada con la inmunidad en la que las células T median directa o indirectamente o contribuye de otro modo a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede asociarse a efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso efectos asociados a las células B si las células B son estimuladas, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por las células T.

Ejemplos de enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamatorias, algunas de las cuales están mediadas por células T, que pueden tratarse según la invención, incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por la inmunidad), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por la inmunidad (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, trastorno inflamatorio del intestino (IBD) (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunitarias o mediadas con la inmunidad que incluyen enfermedades ampollosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes que incluyen rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped. Enfermedades infecciosas que incluyen enfermedades virales tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones protozoicas e infecciones parasitarias también pueden tener componentes y/o etiología inmunitaria y/o inflamatoria.

Varias enfermedades de la piel están correlacionadas con una respuesta inmunitaria aberrante y con la autoinmunidad. Enfermedades tales como la psoriasis tienen como marca característica la formación de ampollas de la piel, descamación de la piel, edema y la presencia de autoanticuerpos que se unen a las proteínas de la piel. En la presente solicitud, los experimentos determinan que la expresión de TIGIT está regulada por incremento en piel psoriásica frente a piel normal. La modulación de la expresión y/o actividad de TIGIT puede ser útil en el tratamiento de los síntomas o las causas subyacentes de la psoriasis.

El término trastorno inflamatorio del intestino ("IBD") describe un grupo de trastornos inflamatorios crónicos de causas desconocidas, en los que el intestino (entrañas) se inflama, causando frecuentemente calambres o diarrea frecuentes. Se estima que la prevalencia de IBD en los EE.UU. es de aproximadamente 200 por cada 100.000 de población. Los pacientes con IBD pueden dividirse en dos grupos principales, aquellos con colitis ulcerosa ("UC") y aquellos con enfermedad de Crohn ("CD").

En pacientes con UC, hay una reacción inflamatoria que involucra principalmente a la mucosa colónica. La inflamación es normalmente uniforme y continua sin áreas intermedias de mucosa normal. Las células de la mucosa superficial, así como el epitelio y la submucosa de la cripta, participan en una reacción inflamatoria con infiltración de neutrófilos. Finalmente, esta situación progresa normalmente al daño epitelial con pérdida de células epiteliales produciendo múltiples ulceraciones, fibrosis, displasia y retracción longitudinal del colon. La CD se diferencia de la UC en que la inflamación se extiende a través de todas las capas de la pared intestinal e implica al mesenterio, así como a los ganglios linfáticos. La CD puede afectar a cualquier parte del canal alimenticio desde la boca hasta el ano. La enfermedad es frecuentemente discontinua, es decir, segmentos gravemente enfermos del intestino se separan de áreas aparentemente libres de la enfermedad. En la CD, la pared intestinal también se engrosa, que puede conducir a obstrucciones. Además, son comunes fístulas y fisuras.

Clínicamente, la IBD está caracterizada por diversas manifestaciones que producen frecuentemente un curso crónico impredecible. La diarrea sanguinolenta y el dolor abdominal frecuentemente están acompañados de fiebre y pérdida de peso. La anemia es común, así como la fatiga grave. Las manifestaciones de las articulaciones varían de artralgia a artritis aguda, así como anomalías en la función del hígado que están comúnmente asociadas a la IBD. Los pacientes con IBD también tienen un riesgo elevado de carcinomas de colon en comparación con la población general. Durante los "ataques" agudos de IBD, el trabajo y otra actividad normal son normalmente imposibles, y frecuentemente un paciente es hospitalizado.

Aunque la causa de la IBD sigue siendo desconocida, se han implicado varios factores, tales como genéticos, infecciosos y susceptibilidad inmunológica. La IBD es mucho más común en los caucásicos, especialmente aquellos de ascendencia judía. La naturaleza inflamatoria crónica de la afección ha causado una búsqueda intensa de una

posible causa infecciosa. Aunque se han encontrado agentes que estimulan la inflamación aguda, no se ha encontrado que ninguno cause la inflamación crónica asociada a la IBD. La hipótesis de que la IBD es una enfermedad autoinmunitaria está apoyada por la manifestación extraintestinal previamente mencionada de la IBD como artritis de las articulaciones, y la respuesta positiva conocida a la IBD mediante el tratamiento con agentes terapéuticos, tales como glucocorticoides suprarrenales, ciclosporina y azatioprina, que son conocidos por suprimir la respuesta inmunitaria. Además, el tubo GI, más que cualquier otro órgano del cual, está continuamente expuesto a posibles sustancias antigénicas, tales como las proteínas de los alimentos, subproductos bacterianos (LPS), etc.

Además, el riesgo de cáncer de colon es altamente elevado en pacientes con colitis ulcerosa grave, particularmente si la enfermedad ha existido durante varios años. Aproximadamente el 20-25 % de los pacientes con IBD eventualmente requieren cirugía para eliminar el colon, debido al sangrado masivo, enfermedad debilitante crónica, perforación del colon o riesgo de cáncer. La cirugía se realiza también algunas veces cuando otras formas de tratamiento médico fallan o cuando los efectos secundarios de los esteroides u otras medicaciones amenazan la salud del paciente. Como la cirugía es invasiva y altera drásticamente la vida, no es una pauta de tratamiento altamente deseable, y normalmente es el tratamiento de último recurso. Con el fin de entender mejor esta enfermedad y posiblemente tratarla, los experimentos determinaron que la TIGIT estaba regulada por incremento tanto en la CD como en la UC cuando se compararon con tejido normal. La modulación de la expresión y/o actividad de TIGIT puede probar ser útil en el tratamiento de una o más formas de IBD.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria sistémica crónica que involucra principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones, con lesión resultante del cartílago articular. La patogénesis es dependiente de linfocitos T y está asociada con la producción de factores reumatoides, autoanticuerpos dirigidos contra IgG autóloga, con la formación resultante de complejos inmunitarios que alcanzan altos niveles en el líquido sinovial y la sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir el marcado infiltrado de linfocitos y monocitos en el sinovio y cambios sinoviales marcados posteriores; el espacio articular/líquido sinovial es infiltrado por células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, frecuentemente en un patrón simétrico. Sin embargo, también se produce enfermedad extrarticular en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extrarticulares con la enfermedad de las articulaciones progresiva en curso y las lesiones típicas de fibrosis pulmonar, vasculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extrarticular es el llamado síndrome de Felty, que aparece tarde en el transcurso de la enfermedad de RA, algunas veces después de que la enfermedad de las articulaciones se haya vuelto quiescente, e involucra la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esta puede ir acompañada por vasculitis en múltiples órganos con la formación de infartos, úlceras de la piel y gangrena. Los pacientes también desarrollan frecuentemente nódulos reumáticos en el tejido del subcutis que recubre las articulaciones afectadas; la etapa tardía de los nódulos tiene centros necróticos rodeados por un infiltrado de células inflamatorias mezcladas. Otras manifestaciones que pueden ocurrir en la RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza frecuentemente con menos de 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que son positivos al factor reumatoide son clasificados como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser grave y es normalmente destructiva y conduce a anquilosis de las articulaciones y crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

El término "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido y/o un agonista/antagonista que produce alcanzar un fin establecido particular. Una "cantidad eficaz" de un polipéptido o agonista o antagonista del mismo puede ser determinada empíricamente. Además, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una concentración o cantidad de un polipéptido y/o agonista/antagonista que es eficaz para lograr un efecto terapéutico establecido. Esta cantidad también puede ser determinada empíricamente.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir los isótopos radiactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animales, o fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la patente de EE.UU. N.º 4.675.187), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se incluye en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como tamoxifeno y onapristona.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa en exceso cualquiera de los genes identificados en el presente documento, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan en exceso tales genes en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también llegan a afectar la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional, por ejemplo, en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúa en otras células como mediadores intracelulares. Ciertos ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas están, por ejemplo, la hormona del crecimiento tal como la hormona del crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana N-metionilo y la hormona del crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glucoproteína tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor del crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores del crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento I y II similar a la insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Como usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es distinta del reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo"), y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Como se usa en el presente documento, el término "células inflamatorias" designa células que potencian la respuesta inflamatoria tal como células mononucleares, eosinófilos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

II. Composiciones y métodos de la invención

Previamente se ha identificado TIGIT como un supuesto modulador de la función inmunitaria (véase, por ejemplo, la publicación de la patente de EE.UU. N.º US20040121370). En el presente documento, los solicitantes demuestran que TIGIT es un miembro de una familia descrita recientemente de proteínas relacionadas con la inmunidad denominada la familia de "proteínas similares a TIGIT" (TLP) que incluye el receptor del virus de la poliomieltitis (PVR, también conocido como NECL5 o CD155), proteínas 1-4 similares al PVR (PVRL1-4), CD96 y CD226. Los solicitantes desvelan los elementos estructurales conservados de esta nueva familia TLP, cuyos miembros desempeñan funciones en la regulación y función inmunitaria, y desvelan métodos para identificar los miembros de la familia adicionales. PVRL1-4 y PVR comparten una arquitectura del dominio común (IgV-IgC-IgV), mientras que CD226 y CD96 carecen del dominio IgV proximal de la membrana. Los segmentos intracelulares de estas ocho proteínas muestran únicamente una similitud limitada entre sí fuera del motivo de unión de afadina compartido entre PVRL1-3; PVRL4 carece de esta secuencia, pero se sabe todavía que se une a la afadina. Basándose en la estructura cristalina del dominio IgV relacionado de NECL-1 (Dong et al., *J. Biol. Chem.* 281: 10610-17 (2006)), se predice que el primer y tercer motivos caen en los bucles de la horquilla entre las hebras beta B y C y F y G, respectivamente. Estos dos bucles son adyacentes entre sí en un extremo del pliegue IgV. El segundo motivo comprende las hebras beta C' y C" que están involucradas en formar parte de la interfase homodimérica para NECL-1. Así, estos motivos de la secuencia pueden desempeñar una función en las interacciones homo y heterotípicas específicas observadas entre los miembros de la familia del PVR.

Los miembros de la familia TLP comprenden varios aminoácidos absolutamente conservados, incluyendo alanina⁶⁷, glicina⁷⁴, prolina¹¹⁴ y glicina¹¹⁶. Además, los miembros de la familia TLP comprenden varios aminoácidos que están sustancialmente conservados (por ejemplo, encontrados en la mayoría de los miembros de la familia, pero no en cada miembro de la familia), incluyendo un aminoácido seleccionado de valina, isoleucina y leucina en la posición 54, un aminoácido seleccionado de serina y treonina en la posición 55, una glutamina en la posición 56, una treonina en la posición 112, y un aminoácido seleccionado de fenilalanina y tirosina en la posición 113. Los miembros de la familia TLP también comprenden tres submotivos estructurales: valina/isoleucina³⁴-serina/treonina⁵⁵-glutamina⁵⁶, alanina⁶⁷-X⁶⁸⁻⁷³-glicina⁷⁴ (donde X es cualquier aminoácido); y treonina¹¹²-fenilalanina/tirosina¹¹³-prolina¹¹⁴-X¹¹⁵-glicina¹¹⁶ (donde X es cualquier aminoácido). Se entenderá por un experto habitual en la materia que la numeración usada anteriormente es con respecto a la secuencia de la proteína TIGIT humana, y aunque la posición relativa de estos restos y motivos conservados en diferentes miembros de la familia de la proteína TLP es idéntica a la posición de aquellos aminoácidos en la secuencia de la TIGIT humana, la numeración absoluta de esos restos en otros miembros de la familia TLP puede diferir.

Dada la implicación de los miembros de la familia TLP identificada en la regulación y función inmunitaria, también probablemente otros miembros de esta familia de proteínas están involucrados en la regulación y función inmunitaria. En consecuencia, la divulgación proporciona métodos de determinación de si una proteína dada es un miembro de la familia TLP alineando la secuencia de la proteína con las secuencias de uno o más de los miembros de la familia identificados anteriormente y evaluando la presencia o ausencia en la secuencia de proteína dada de los restos conservados de manera absoluta identificados anteriormente, los restos conservados sustancialmente identificados anteriormente, y/o los submotivos estructurales identificados anteriormente. La divulgación también proporciona métodos de identificación de otros miembros de la familia de la proteína TLP buscando en una o más bases de datos de las secuencias para las proteínas cuyas secuencias de aminoácidos comprenden los restos conservados de manera absoluta identificados anteriormente, los restos conservados sustancialmente identificados anteriormente y/o los submotivos estructurales identificados anteriormente.

La identificación de la familia TLP por los solicitantes en el presente documento también presenta la posibilidad de que las características estructurales comunes de los miembros de la familia TLP puedan permitir que dos o más miembros de la familia TLP se modulen similarmente. Por ejemplo, si los restos de aminoácidos y submotivos conservados y sustancialmente conservados en cada miembro de la familia TLP dan lugar a estructuras tridimensionales similares en aquellos miembros de la familia en uno o más dominios de cada proteína, entonces aquellas estructuras tridimensionales similares pueden ser elegidas como diana con el fin de modular simultáneamente más de un miembro de la familia TLP, o incluso todos los miembros de la familia TLP al mismo tiempo. La divulgación también proporciona así agentes ("agentes que interaccionan con TLP"), que interaccionan específicamente con tales regiones conservadas o sustancialmente conservadas de los miembros de la familia TLP. Tales agentes pueden usarse para identificar uno o más miembros adicionales de la familia TLP, evaluando si una proteína candidata interacciona con un agente que interacciona con TLP. La interacción de la proteína candidata con el agente que interacciona con TLP puede indicar que la proteína también puede ser un miembro de la familia TLP. Los agentes que interaccionan con TLP pueden modular la actividad de TLP. Por ejemplo, un agente que interacciona con TLP puede ser un antagonista de la actividad de TLP, que incluye, pero no se limita a, un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento que se une al antígeno del mismo, un aptámero y un péptido inhibidor. En otro ejemplo, un agente que interacciona con TLP puede ser un agonista de la actividad de TLP, que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo agonizante o un fragmento que se une al antígeno del mismo, un péptido agonizante, y una molécula pequeña que estabiliza una estructura de la proteína TLP para facilitar la actividad de la proteína TLP. Los agentes que interaccionan con TLP pueden identificarse en varias formas conocidas, por ejemplo, usando los métodos de cribado descritos en el presente documento.

Los solicitantes muestran mediante análisis de ARNm y FACS que la TIGIT se expresa de manera predominante en varias células T activadas, particularmente células T reguladoras (T_{reg}), células T de memoria, células NK y células T auxiliares de las células B foliculares (T_{fh}), aisladas de tejido amigdalino. Así, la invención proporciona métodos de identificación de si una célula seleccionada es o no una célula T_{reg}, célula T de memoria, célula NK o célula T_{fh} basándose en si la célula expresa o no a TIGIT. La divulgación también proporciona métodos de uso de TIGIT para purificar T_{reg}, células T de memoria, células NK y células T_{fh} de otros tipos de células inmunitarias que no expresan TIGIT, usando cualquiera de los métodos de purificación conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento (como un ejemplo no limitante, mediante citometría de flujo). Los solicitantes también demuestran que la expresión más alta de TIGIT en estas poblaciones celulares aparece en células T_{reg} activadas. Así, la invención también proporciona métodos de identificación de si una célula dada es una T_{reg} activada basándose en su nivel de expresión de TIGIT con respecto a los niveles de expresión de TIGIT en una o más muestras de control (donde las muestras de control pueden ser valores predeterminados de poblaciones de subconjuntos de células T a modo de ejemplo, o las muestras de control pueden ser otras muestras de subpoblaciones de células T conocidas, tales como células T_{reg} activadas, células T_{reg} no activadas, células T intactas, células T de memoria, células NK, células T_{fh} u otras poblaciones de células T). También se proporcionan métodos de determinación de si una célula T_{reg} dada está activada, determinando su nivel de expresión de TIGIT con respecto a los niveles de expresión de TIGIT en una o más muestras de T_{reg} activadas o inactivadas de control, o con respecto a valores de expresión de TIGIT predeterminados en poblaciones de células T_{reg} activadas o inactivadas conocidas. Se proporcionan además métodos para aislar de manera separada las T_{reg} activadas de otras células T usando cualquiera de los métodos de

purificación conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, donde la cantidad de TIGIT expresada en la célula puede usarse para separar la célula de otras células (como un ejemplo no limitante, mediante citometría de flujo).

5 Los solicitantes demuestran en el presente documento que TIGIT se une estrechamente al PVR, y se une con una Kd menor al PVRL3 (también conocido como nectina-3 o CD113) y el PVRL2 (también conocido como nectina-2 o CD112). Como se ejemplifica por los solicitantes, la TIGIT que se une al PVR bloquea la interacción del PVR con otros dos ligandos, CD226 y CD96, y CD226 es un inhibidor menos eficaz de la interacción TIGIT-PVR que la TIGIT es de la interacción PVR-CD226. Los solicitantes produjeron anticuerpos anti-TIGIT (por ejemplo, el anticuerpo anti-
10 TIGIT 10A7 descrito en la presente), que inhibió la unión de TIGIT o una proteína de fusión de TIGIT al PVR expresado en la superficie celular. Los solicitantes produjeron además otros anticuerpos, tales como el anticuerpo 1F4 descrito en el presente documento, con diferentes especificidades del epítope en TIGIT que 10A7. En particular, CD226 no se expresa significativamente en las células T_{reg} o T_{FH} , dos tipos de células que expresan altamente TIGIT.

15 Apoyada por estos hallazgos, la divulgación proporciona agonistas y antagonistas de la interacción TIGIT-PVR, la interacción TIGIT-PVRL2 y la interacción TIGIT-PVRL3, y métodos de modulación de la unión de TIGIT-PVR, la unión de TIGIT-PVRL2 y la unión de TIGIT-PVRL3 *in vitro* o *in vivo* usando tales agonistas y antagonistas. También se proporcionan métodos de modulación de la interacción de CD226-PVR y/o la interacción de CD96-PVR, administrando TIGIT (un competidor para la unión del PVR) o un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento que se une al
20 antígeno del mismo *in vitro* o *in vivo*. La invención incluye además anticuerpos anti-TIGIT y fragmentos de los mismos, tanto agonizantes como antagonizantes, y en particular, anticuerpos anti-TIGIT 10A7 y 1F4 y tipos alternos de anticuerpos que comprenden las CDR del anticuerpo anti-TIGIT 10A7 y/o 1F4.

25 Los estudios descritos en el presente documento demuestran la interacción de TIGIT con PVR en DC, y muestran que esta interacción de unión modula la función de DC, particularmente la producción de citocinas. PVR es un receptor de la superficie celular conocido por estar altamente expresado en células dendríticas (DC), así como FDC, fibroblastos, células endoteliales y algunas células tumorales (Sakisaka, T. & Takai, Y., *Curr Opin Cell Biol* 16, 513-21 (2004); Fuchs, A. & Colonna, M., *Semin Cancer Biol* 16, 359-66 (2006)). Las DC humanas unidas a TIGIT secretan altos niveles de IL-10 y menos citocinas proinflamatorias y otras citocinas (tales como IL-12p40, IL-12p70, IL-6, IL-18 e IFN γ). TIGIT no tenía un efecto sobre la producción de ciertas citocinas tales como IL-23. Esta citocina que se tuerce tras la unión a TIGIT se observó únicamente en células que habían sido estimuladas por TNF α o CD40/LPS, y no en células estimuladas con TLR2 o Pam3CSK4, sugiriendo que TIGIT es un medio mediante el cual el sistema inmunitario puede afinar la función de DC. La unión de TIGIT a células T inmaduras (como se evaluó
35 usando construcciones de fusión de TIGIT) inhibió la activación y proliferación de células T. Sin embargo, el tratamiento de TIGIT no afectó la capacidad de DC derivadas de los monocitos inmaduros (iMDDC) para madurar, ni indujo directamente la maduración de esas células. En particular, esta inhibición se invirtió en presencia de un inhibidor de ERK, indicando que la activación de ERK puede ser una etapa importante en el funcionamiento de TIGIT para modular la actividad de DC. En realidad, los solicitantes demuestran que la unión de TIGIT a PVR produce la fosforilación de PVR y el aumento de la fosforilación del dímero de pERK, pero no el monómero de pERK. Este no fue un efecto generalizado, ya que, por ejemplo, la vía de señalización intracelular p38 no fue modulada por el tratamiento con TIGIT-Fc de las células. Los solicitantes muestran en el presente documento que las células T TIGIT⁺ suprimen la proliferación de no solo otras células T TIGIT⁺, sino también las células presentadoras de antígenos, cuando están presentes en una población mixta de células inmunitarias. Los
45 solicitantes demostraron además que la interacción TIGIT-PVR media en los efectos observados anteriormente, ya que la inclusión de un anticuerpo anti-TIGIT o un anticuerpo anti-PVR en los experimentos redujo enormemente la inhibición de la proliferación observada, la modulación de la producción de las citocinas DC y la supresión de la proliferación de otras células inmunitarias. En general, los datos proporcionados por los solicitantes en el presente documento sugieren que TIGIT proporciona un mecanismo de retroalimentación del sistema inmunitario regulando
50 negativamente la respuesta inmunitaria.

Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos de modulación de la función de células inmunitarias (por ejemplo, DC), modulando la expresión y/o actividad de TIGIT o PVR. Por ejemplo, se proporcionan métodos para disminuir o inhibir la proliferación de células inmunitarias (por ejemplo, DC o células presentadoras de antígenos)
55 tratando las células inmunitarias *in vitro* o *in vivo* con TIGIT, un agonista de la expresión y/o actividad de TIGIT, o un agonista de la expresión y/o actividad de PVR. También se proporcionan métodos para aumentar la proliferación de células inmunitarias (por ejemplo, DC o células presentadoras de antígenos), tratando las células inmunitarias *in vitro* o *in vivo* con un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT o un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR. La invención también proporciona métodos para aumentar/estimular una respuesta inmunitaria administrando un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT o un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR. Similarmente se proporcionan métodos para disminuir/inhibir una respuesta inmunitaria administrando TIGIT, un agonista de la expresión y/o actividad de TIGIT o un agonista de la expresión y/o actividad de PVR.
60

También se proporcionan métodos de modulación del tipo y/o cantidad de producción de citocinas de una célula inmunitaria (por ejemplo, DC), modulando la expresión y/o actividad de TIGIT o PVR. Específicamente, la divulgación proporciona métodos de aumento de la producción de IL-10 mediante células inmunitarias, por ejemplo,
65

DC, tratando las células *in vitro* o *in vivo* con TIGIT, un agonista de la expresión y/o actividad de TIGIT, o un agonista de la expresión y/o actividad de PVR. También se proporcionan métodos de disminución de la producción y/o liberación de citocinas proinflamatorias por las células inmunitarias, por ejemplo, DC, tratando las células *in vitro* o *in vivo* con TIGIT, un agonista de la expresión y/o actividad de TIGIT, o un agonista de la expresión y/o actividad de PVR. Similarmente, también se proporcionan métodos de disminución de la producción de IL-10 por las células inmunitarias, por ejemplo, DC, tratando las células *in vitro* o *in vivo* con un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT o un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR. La divulgación proporciona además métodos de aumento de la producción y/o liberación de citocinas proinflamatorias por las células inmunitarias, por ejemplo, DC, tratando las células *in vitro* o *in vivo* con un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT o un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR. También se proporcionan métodos de estimulación de la fosforilación y/o señalización intracelular de ERK a través de la vía de ERK en una o más células, tratando las células con TIGIT, un agonista de la expresión y/o actividad de TIGIT, o un agonista de la expresión y/o actividad de PVR. Similarmente, la divulgación proporciona métodos de inhibición o disminución de la fosforilación y/o la señalización intracelular de ERK a través de la vía de ERK en una o más células, tratando las células con un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT o un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR.

TIGIT aumenta en la expresión en tejidos de artritis, psoriasis, trastorno inflamatorio del intestino y cáncer de mama, con respecto a los tejidos de control normales, como se muestra en el presente documento. Con respecto a los tejidos de cáncer de mama, los solicitantes muestran que la expresión de TIGIT no se correlaciona con células del tumor por sí mismas, sino con los infiltrados de las células inmunitarias CD4⁺ en los tumores. Los solicitantes también demuestran directamente la capacidad de TIGIT para modular la respuesta inmunitaria, mostrando que una proteína de fusión de TIGIT inhibió las respuestas de las células T humanas *in vitro* y la activación de células T murinas en un ensayo de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos de diagnóstico de enfermedades/trastornos que involucran la respuesta aberrante de las células inmunitarias en un sujeto, evaluando la expresión y/o actividad de TIGIT en una muestra del sujeto y comparando la expresión y/o actividad con una cantidad de referencia de la expresión y/o actividad de TIGIT o la cantidad de la expresión y/o actividad de TIGIT en una muestra de un sujeto normal. La divulgación también proporciona métodos de evaluación de la gravedad de una enfermedad o trastorno que involucra una respuesta aberrante de las células inmunitarias (es decir, una enfermedad relacionada con la inmunidad) en un sujeto, evaluando la expresión y/o actividad de TIGIT en una muestra del sujeto, y comparando la expresión y/o actividad con una cantidad de referencia de la expresión y/o actividad de TIGIT o la cantidad de la expresión y/o actividad de TIGIT en una muestra de un sujeto normal. También se proporcionan métodos de prevención de una enfermedad o trastorno, que involucra la respuesta aberrante de las células inmunitarias (es decir, una enfermedad relacionada con la inmunidad), modulando la expresión y/o actividad de TIGIT. Además se proporcionan métodos de tratamiento o disminución de la gravedad de una enfermedad o trastorno que involucra una respuesta aberrante de las células inmunitarias (es decir, una enfermedad relacionada con la inmunidad), modulando la expresión y/o actividad de TIGIT. La modulación de la expresión y/o actividad de TIGIT puede tomar la forma de inhibir la actividad y/o expresión de TIGIT (es decir, con un antagonista de TIGIT o un antagonista de PVR), cuando las actividades reguladoras negativas de TIGIT están contribuyendo al estado de enfermedad. Por ejemplo, el antagonizar la expresión y/o actividad de TIGIT puede ser deseable cuando se desea un aumento en la proliferación de DC y/o un aumento de la producción de las citocinas proinflamatorias por las DC. La modulación de la expresión y/o actividad de TIGIT puede tomar la forma de activar o aumentar la expresión y/o actividad de TIGIT (es decir, administrar TIGIT, un agonista de TIGIT o un agonista de PVR), cuando las actividades reguladoras negativas de TIGIT sean deseables para controlar un estado de enfermedad. Por ejemplo, el agonizar la expresión y/o actividad de TIGIT puede ser deseable cuando se desea una disminución en la proliferación de DC y/o una liberación disminuida de citocinas proinflamatorias por DC. Estos y otros aspectos de la divulgación se describen en mayor detalle en el presente documento posteriormente.

A. Polipéptidos de TIGIT de longitud completa

La presente divulgación proporciona secuencias de nucleótidos aisladas que codifican los polipéptidos referidos en la presente solicitud como polipéptidos de TIGIT. En particular, los ADNc que codifican diversos polipéptidos de TIGIT se han identificado y aislado, como se desvela en más detalle en la memoria descriptiva y los ejemplos más adelante. Se entenderá por un experto habitual en la materia que la divulgación también proporciona otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención (es decir, PVR), y que cualquiera de la descripción en el presente documento se dirige específicamente al método de creación, producción, marcado, modificación postraducciona, uso u otros aspectos de los polipéptidos de TIGIT, también será aplicable a otros polipéptidos que no son de TIGIT.

B. Variantes del polipéptido de TIGIT

Además de los polipéptidos de TIGIT de secuencia nativa de longitud completa descritos en el presente documento, se contempla que puedan prepararse variantes de TIGIT. Las variantes de TIGIT pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en polinucleótido de TIGIT, y/o mediante síntesis del polipéptido de TIGIT deseado. Aquellos expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar procesos postraduccionales de TIGIT tales como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a la membrana del polipéptido.

Las variaciones en la secuencia de TIGIT de longitud completa nativa o en varios dominios de TIGIT descritas en el presente documento pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección y/o inserción de uno o más codones que codifican TIGIT que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos de TIGIT en comparación con TIGIT de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de TIGIT. La orientación para determinar qué resto de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia de TIGIT con las de moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones puede estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

En el presente documento también se proporcionan fragmentos de polipéptidos de TIGIT. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido de TIGIT.

Los fragmentos de TIGIT pueden prepararse por distintas técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Una solución alternativa implica generar fragmentos de TIGIT por digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Todavía otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores de 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos de polipéptidos de TIGIT comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido de TIGIT nativo desvelado en el presente documento.

En ciertas particulares, sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 5 bajo el encabezamiento de Sustituciones preferidas. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados Sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 5, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos se criban.

Tabla 5

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile lys; gln; asn	val lys
Arg (R)	gln; his; lys; arg	gln
Asn (N)		glu
Asp (D)	glu	ser
Cys (C)	ser	asn
Gln (Q)	asn	asp
Glu (E)	asp	ala
Gly (G)	pro; ala	arg
His (H)		
Ile (I)	asn; gln; lys; arg	leu
Leu (L)	leu; val; met; ala; phe; norleucina norleucina; ile; val;	ile arg
Lys (K)	met; ala; phe	leu
Met (M)	arg; gln; asn	leu
Phe (F)	leu; phe; ile	ala
Pro (P)	leu; val; ile; ala; tyr	thr
Ser (S)	ala	ser
Thr (T)	thr	tyr
Trp (W)	ser	phe
Tyr (Y)	tyr; phe	
Val (V)		leu
	trp; phe; thr; ser	
	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	

Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido se llevan a cabo

seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los restos que existen de forma natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadenas: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implican intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los restantes sitios (no conservados).

Las variaciones pueden hacerse usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida a sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis con selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN de variante.

El análisis de aminoácidos por barrido también puede emplearse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos por barrido preferidos están aminoácidos neutros relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de TIGIT

Las modificaciones covalentes de TIGIT están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos elegidos como diana de un polipéptido con un agente derivatizante orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos del extremo N o C del polipéptido de TIGIT. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el polipéptido de TIGIT con una matriz de soporte insoluble en agua para su uso en el método para purificar anticuerpos anti-TIGIT, y viceversa. Agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluye ésteres de disuccinimidilo tales como propionato de 3,3'-ditiobis(succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo.

Otras modificaciones incluyen desamidación de restos de glutaminilo y asparaginilo para los restos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)], acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos de TIGIT incluida dentro del alcance de la presente divulgación comprende alterar el patrón de glucosilación nativa del polipéptido. "Alterar el patrón de glucosilación nativa" está previsto que signifique para los fines en el presente documento delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en una TIGIT de la secuencia nativa (tanto eliminando el sitio de glucosilación subyacente como delecionando la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en la TIGIT de la secuencia nativa. Además, el término incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, que implica un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de hidrato de carbono presentes. La adición de sitios de glucosilación a un polipéptido puede realizarse alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración puede hacerse, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina al polipéptido de la secuencia nativa (para sitios de glucosilación ligados a O). La secuencia de aminoácidos del polipéptido puede alterarse opcionalmente mediante cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido en bases preseleccionadas de forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de restos de hidrato de carbono sobre el polipéptido es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la materia, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306 (1981).

La eliminación de restos de hidrato de carbono presentes sobre el polipéptido puede llevarse a cabo químicamente o enzimáticamente, o por sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven de dianas para la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono sobre polipéptidos pueden lograrse por el uso de varias endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido desvelado en el presente documento comprende ligar el polipéptido a uno de varios polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. N.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden modificarse de forma que se forme una molécula química que comprende un polipéptido fusionado con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos.

En una realización, una molécula quimérica tal comprende una fusión del polipéptido de interés con una marca que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-marca. La marca de epítipo se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del polipéptido de interés. La presencia de tales formas marcadas con epítipo del polipéptido de interés puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido de marca. Por tanto, la provisión de la marca de epítipo permite que el polipéptido de interés se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la marca de epítipo. Diversos polipéptidos de marca y sus anticuerpos respectivos son muy conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen marcas de poli-histidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-Gly); el polipéptido de marca de HA flu y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y la marca de glucoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de marca incluyen, pero no se limitan a, el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de alfa-tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y la marca del péptido de proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada una "inmunoadhesina"), una fusión tal podría ser la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana delecionado o inactivado) de un polipéptido en lugar de al menos un región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización, la fusión de inmunoglobulinas incluye las regiones bisagra, CH₂ y CH₃, o bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véase también la patente de EE.UU. N.º 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

D. Preparación de polipéptidos

La descripción más adelante se refiere principalmente a la producción de polipéptidos cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Por supuesto, se contempla que pueden emplearse métodos alternativos, que son muy conocidos en la técnica, para preparar polipéptidos. Por ejemplo, la secuencia de polipéptidos, o porciones de la misma, puede producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida [véanse, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteína *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Diversas porciones del polipéptido pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido de longitud completa.

1. Aislamiento de ADN que codifica el polipéptido

El ADN que codifica un polipéptido de interés puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm del polipéptido y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN humano que codifica el polipéptido puede obtenerse convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el polipéptido también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis automática de ácidos nucleicos).

Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como anticuerpos para el polipéptido u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos habituales tal como se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el polipéptido es usar metodología PCR [Sambrook et al., arriba; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los ejemplos posteriores describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente inequívocas de forma que se minimicen falsos positivos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de forma que pueda detectarse tras la hibridación con ADN en la biblioteca que está cribándose. Los métodos de marcado son muy conocidos en la técnica e incluyen el uso de radiomarcas como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcado con enzimas. Las condiciones de hibridación, que incluyen rigurosidad moderada y alta rigurosidad, se proporcionan en Sambrook et al., arriba.

Las secuencias identificadas en tales métodos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencias (a tanto el nivel de aminoácidos como de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica y como se describen en el presente documento.

La secuencia que codifica proteínas que tienen ácidos nucleicos puede obtenerse cribando ADNc seleccionado o bibliotecas genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida desvelada en el presente documento por primera vez y, si fuera necesario, usando procedimientos de extensión de cebadores convencionales como se describen en Sambrook et al., arriba, para detectar precursores y productos intermedios de procesamiento de ARNm que pueden no haber sido transcritos de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de polipéptidos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto sin experimentación adicional. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., arriba.

Los métodos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos para el experto general, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook et al., arriba, o la electroporación se usan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales como se describe por Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares puede emplearse el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978).

Los aspectos generales de las transfecciones del sistema hospedador de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. N.º 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el método de Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos de introducción de ADN en células tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero véanse Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores. Procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC

31,446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido ya que es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el hospedador, incluyendo ejemplos de tales hospedadores la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación por delección *degP* resistente a no kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de EE.UU. N.º 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente son adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. N.º 4.943.529; Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz de crecer en metanol seleccionada de los géneros que están constituidos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específica que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, *The Biochemistry of Methyloprotophytes*, 269 (1982).

Células hospedadoras adecuadas para la expresión del polipéptido glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, además de células vegetales. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovarios de hámster chino (CHO) y COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT060562, ATCC CCL51). La selección de la célula hospedadora apropiada se considera que está dentro de la experiencia de la técnica.

3. Selección y uso de un vector replicable

El polipéptido que codifica ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Diversos vectores están públicamente disponibles. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante varios procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) de endonucleasas de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación habituales que son conocidas para el experto.

El polipéptido puede producirse recombinantemente no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido que se inserta en el vector. La

secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la levadura invertasa, líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente de EE.UU. N.º 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o relacionadas, además de líderes secretores víricos.

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Tales secuencias son muy conocidas para varias bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmidos 2 μ es adecuado para levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polio, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para recibir el ácido nucleico que codifica polipéptidos tal como DHFR o timidina cinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor operativamente unido a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los polipéptidos para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos mediante varias posibles células hospedadoras son muy conocidos. Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776] y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica polipéptidos.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess et al., J. Adv. Enzyme Res., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)] tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

La transcripción de polipéptidos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del polio, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el

potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el polipéptido, pero preferentemente está localizado en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones sin traducir en 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica el polipéptido.

Todavía otros métodos, vectores y células hospedadoras adecuados para la adaptación a la síntesis de un polipéptido de interés en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

4. Detección de la amplificación/expresión de genes

La amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* usando una sonda apropiadamente marcada basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex sobre la superficie pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Alternativamente, la expresión de genes puede medirse por métodos inmunológicos tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra secuencia exógena fusionada a ADN que codifica el polipéptido y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación de polipéptido

Las formas de un polipéptido de interés pueden recuperarse a partir de medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si está unido a membrana puede desprenderse de la membrana usando una solución de detergente adecuado (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del polipéptido pueden romperse por diversos medios físicos o químicos tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

Puede desearse purificar el polipéptido a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítopes del polipéptido. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990) Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y el polipéptido particular producido.

E. Distribución en tejido

La localización de tejidos que expresan el polipéptido puede identificarse determinando la expresión del ARNm en varios tejidos humanos. La localización de tales genes proporciona información sobre cuales tejidos son más probables de ser afectados por las actividades de estimulación e inhibición de los polipéptidos. La localización de un gen en un tejido específico también proporciona un tejido de muestra para los ensayos de bloqueo/activación de la actividad tratados a continuación.

Como se indicó anteriormente, la expresión del gen en varios tejidos puede medirse por medio de transferencia Southern, transferencia Northern convencionales, para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, basada en las secuencias proporcionadas en el presente documento.

Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína.

La expresión del gen en varios tejidos, alternativamente, puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo de cultivo celular o líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Anticuerpos útiles para la tinción y/o el ensayo inmunohistoquímico de los fluidos de muestra pueden ser ya sea monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia nativa de un polipéptido o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN que codifican el polipéptido o contra una secuencia exógena fusionada con ADN que codifica un polipéptido y que codifica un epítipo del anticuerpo específico. Técnicas generales para generar anticuerpos, y protocolos especiales para la transferencia Northern y la hibridación *in situ*, se proporcionan a continuación.

F. Estudios de unión al anticuerpo

La actividad de un polipéptido de la invención puede verificarse además mediante estudios de unión al anticuerpo, en los que se prueba la capacidad de los anticuerpos anti-polipéptido para inhibir el efecto del polipéptido en las células de los tejidos. Anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describirá en el presente documento posteriormente.

Pueden llevarse a cabo estudios de unión al anticuerpo en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitivos, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitivos se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos, preferentemente, se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos puedan separarse convenientemente del patrón y el analito que permanecen no unidos.

Los ensayos de sándwich involucran en uso de dos anticuerpos, uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que va a detectarse. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de prueba se une mediante un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y posteriormente, un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede por sí mismo estar marcado con un resto detectable (ensayos de sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada, o puede incorporarse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

G. Ensayos basados en células

Los ensayos basados en células y los modelos animales para las enfermedades relacionadas con la inmunidad pueden usarse para entender además la relación entre los genes y los polipéptidos identificados en el presente documento y el desarrollo y la patogénesis de la enfermedad relacionada con la inmunidad.

En un enfoque diferente, las células de un tipo de célula conocido por estar involucradas en una enfermedad relacionada con la inmunidad particular se transfectan con los ADNc descritos en el presente documento, y se analiza la capacidad de estos ADNc para estimular o inhibir la función inmunitaria. Células adecuadas pueden transfectarse con el gen deseado, y monitorizarse para la actividad de la función inmunitaria. Tales líneas celulares transfectadas pueden entonces usarse para probar la capacidad de los anticuerpos poli- o monoclonales o composiciones de anticuerpo para inhibir o estimular la función inmunitaria, por ejemplo, para modular la proliferación de células T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en el presente documento pueden usarse además para identificar los fármacos candidatos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad.

Además, pueden usarse cultivos primarios derivados de animales transgénicos (como se describe a continuación) en ensayos basados en células en el presente documento, aunque las líneas celulares estables son más comúnmente usadas en la técnica. Técnicas para derivar líneas celulares continuas de animales transgénicos son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Small et al., Mol. Cell. Biol. 5: 642-648 [1985]).

Un ensayo basado en células adecuado es la reacción de linfocitos mixtos (MLR). Current Protocols in Immunology,

unidad 3.12; editado por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, Institutos Nacionales de Salud, publicado por John Wiley & Sons, Inc. En este ensayo, se analiza la capacidad de un compuesto de prueba para estimular o inhibir la proliferación de las células T activadas. Una suspensión de células T que responden se cultiva con células de un estimulador alógeno y la proliferación de las células T se mide mediante la captación de timidina tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de células T. Como la mayoría de las células T responden a y producen IL-2 tras la activación, las diferencias en la sensibilidad en este ensayo reflejan en parte las diferencias en la producción de IL-2 por las células que responden. Los resultados de MLR pueden verificarse mediante un ensayo de detección de linfocinas estándar (IL-2). Current Protocols in Immunology, anteriormente, 3.15, 6.3.

Una respuesta proliferativa de células T en un ensayo MLR puede deberse a las propiedades mitogénicas directas de una molécula probada o a la activación inducida por un antígeno externo. Verificación adicional de la actividad estimuladora de las células T del polipéptido puede obtenerse mediante un ensayo de coestimulación. La activación de células T requiere una señal específica de antígeno mediada a través del receptor de células T (TCR) y una señal coestimuladora mediada a través de una segunda interacción de unión al ligando, por ejemplo, la interacción de unión de B7 (CD80, CD86)/CD28. La reticulación de CD28 aumenta la secreción de linfocinas por células T activadas. La activación de células T tiene controles tanto negativos como positivos a través de la unión de ligandos, que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glucoproteínas relacionadas de la superfamilia de la Ig, que se unen a B7. CD28 que se une a B7 tiene un efecto de coestimulación positivo de activación de células T; en cambio, CTLA-4 que se une a B7 tiene un efecto de desactivación las células T. Chambers, C. A. y Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol. (1991) 9:396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71:1065; Linsey, P. S. y Ledbetter, J. A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191; June, C. H. et al, Immunol. Today (1994) 15:321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1:405. En un ensayo de coestimulación, los polipéptidos se ensayan para la actividad coestimuladora o inhibidora de células T.

El uso directo de un compuesto estimulador como en la invención ha sido validado experimentos con la glucoproteína 4-1BB, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en células T sensibilizadas y señala la activación y el crecimiento de células T. Alderson, M. E. et al., J. Immunol. (1994) 24:2219.

El uso de un compuesto estimulante del agonista también ha sido validado experimentalmente. Como un ejemplo, la activación de 4-1BB mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-4-1BB del agonista, potencia la erradicación de tumores. Hellstrom, I. y Hellstrom, K. E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18:1. La terapia con inmunoadyuvantes para el tratamiento de tumores, descrita en más detalle más abajo, es otro ejemplo del uso de los compuestos estimulantes de la invención.

Alternativamente, también puede lograrse un efecto estimulante o potenciador de la inmunidad mediante la administración de un polipéptido que tiene propiedades que mejoran la permeabilidad vascular. La permeabilidad vascular potenciada sería beneficiosa para los trastornos que pueden atenuarse por la infiltración local de células inmunitarias (por ejemplo, monocitos, eosinófilos, PMN) e inflamación.

Por otra parte, los polipéptidos de TIGIT, así como otros compuestos de la divulgación, que son inhibidores directos de la proliferación/activación de células T, secreción de citocinas proinflamatorias y/o permeabilidad vascular, pueden usarse directamente para suprimir la respuesta inmunitaria. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de la respuesta inmunitaria y para tratar enfermedades relacionadas con la inmunidad, caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima o autoinmunitaria. Este uso de los compuestos de la invención ha sido validado por los experimentos descritos anteriormente, en los que CTLA-4 que se une al receptor B7 desactiva las células T. Los compuestos inhibidores directos de la invención funcionan de una manera análoga. Se esperaría que el uso de un compuesto que suprime la permeabilidad vascular redujera la inflamación. Tales usos serían beneficiosos para tratar las afecciones asociadas a una inflamación excesiva.

Similarmente, los compuestos, por ejemplo, anticuerpos, que se unen a los polipéptidos inhibidores de TIGIT y bloquean el efecto de estos polipéptidos inhibidores de TIGIT, producen un efecto inhibidor neto y también puede usarse para suprimir la respuesta inmunitaria mediada por células T, dejando a TIGIT libre para inhibir la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfocinas. El bloqueo del efecto inhibidor de los polipéptidos suprime la respuesta inmunitaria del mamífero.

Alternativamente, para afecciones asociadas a una respuesta inmunitaria y/o inflamación mediada por células T insuficiente, la inhibición o disminución de la actividad y/o expresión de TIGIT o la interferencia con la capacidad de TIGIT para unirse a y/o señalar a través del PVR, puede ser beneficiosa para el tratamiento. Tal inhibición o disminución puede proporcionarse mediante la administración de un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT y/o un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR.

H. Modelos animales

Los resultados de los ensayos basados en células *in vitro* pueden verificarse adicionalmente usando modelos animales *in vivo* y ensayos para la función de células T. Puede usarse varios modelos animales bien conocidos para

entender además la función de los genes identificados en el presente documento en el desarrollo y la patogénesis de la enfermedad relacionada con la inmunidad, y para probar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de molécula pequeña. La naturaleza *in vivo* de tales modelos los hace predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con la inmunidad incluyen o bien animales no recombinantes o bien recombinantes (transgénicos). Modelos con animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Tales modelos pueden generarse introduciendo células en ratones singénicos, usando técnicas convencionales, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implante del bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

La enfermedad del injerto contra el huésped se produce cuando las células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células del donante reconocen y responden a antígenos del hospedador. La respuesta puede variar de una inflamación grave potencialmente normal a casos leves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de la enfermedad del injerto contra el huésped proporcionan un medio para evaluar la reactividad de células T contra antígenos del MHC y antígenos menores del trasplante. Un procedimiento adecuado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidad 4.3.

Un modelo animal de rechazo de aloinjerto de piel es un medio para probar la capacidad de las células T para mediar en la destrucción de tejido *in vivo* y una medida de su función en el rechazo de trasplante. Los modelos más comunes y aceptados usan injertos murinos de piel de la cola. Experimentos repetidos han mostrado que el rechazo del aloinjerto de piel está mediado por células T, células T auxiliares y células T citotóxicas-efectoras, y no por los anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2ª ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. Un procedimiento adecuado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo de trasplante que pueden usarse para probar los compuestos de la invención son los modelos de trasplante de corazón alógeno, descritos por Tanabe, M. et al., Transplantation (1994) 58:23 y Tinubu, S. A. et al, J. Immunol. (1994) 4330-4338.

Modelos animales de hipersensibilidad de tipo retardado también proporcionan un ensayo de la función inmunitaria mediada por células. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado son una respuesta inmunitaria mediada por células T *in vivo*, caracterizada por inflamación que no alcanza un pico hasta después de que haya transcurrido un periodo de tiempo después de la exposición a un antígeno. Estas reacciones también se producen en enfermedades autoinmunitarias específicas de tejido, tales como esclerosis múltiple (MS) y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un modelo de MS). Un procedimiento adecuado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidad 4.5.

La EAE es una enfermedad autoinmunitaria mediada por células T caracterizada por la inflamación de células T y células mononucleares y la posterior desmielinización de los axones en el sistema nervioso central. La EAE es generalmente considerada por ser un modelo animal relevante para la MS en seres humanos. Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995) 1:143. Se han desarrollado tanto modelos agudos como de recaída-remisión. Los compuestos de la invención pueden probarse para la actividad estimuladora o inhibidora de células T contra la enfermedad desmielinizante mediada por la inmunidad usando el protocolo descrito en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidades 15.1 y 15.2. Véanse también los modelos para enfermedad de la mielina, en los que oligodendrocitos o células de Schwann se injertan en el sistema nervioso central, como se describió en Duncan, I. D. et al., Molec. Med. Today (1997) 554-561.

La hipersensibilidad de contacto es un ensayo de hipersensibilidad de tipo retardado simple *in vivo* de la función inmunitaria mediada por células. En este procedimiento, se mide la exposición cutánea a los haptenos exógenos que dan lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado y se cuantifica. La hipersensibilidad de contacto involucra una fase de sensibilización inicial, seguida por una fase de provocación. La fase de provocación ocurre cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el que han tenido un contacto previo. Ocurre hinchazón e inflamación, haciendo de éste un modelo excelente de dermatitis de contacto alérgica humana. Un procedimiento adecuado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, Eds. J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2. Véase también Grabbe, S. y Schwarz, T, Immun. Today 19 (1) : 37-44 (1998).

Un modelo animal para la artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte las características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable para la artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y de rata están caracterizados por sinovitis, erosión del cartílago y el hueso subcondral. Los compuestos de la invención pueden probarse para la actividad contra la artritis autoinmune usando los protocolos descritos en Current Protocols in Immunology, anteriormente, unidades 15.5. Véase también el modelo que usa un anticuerpo monoclonal para las integrinas CD18 y VLA-4, descrito en Issekutz, A.C. et al., Immunology (1996) 88:569.

El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) se considera un modelo adecuado para estudiar posibles fármacos o compuestos biológicos activos en artritis humana, debido a las muchas similitudes inmunológicas y patológicas con la artritis reumatoide (RA) humana, implicación de la histocompatibilidad mayor localizada, activación completa

de linfocitos T auxiliares restringidos a la clase II y similitud de las lesiones histológicas. Las características de este modelo de CIA que son similares a aquellas encontradas en pacientes con RA incluyen: erosión de cartílago y el hueso en los márgenes de la articulación (como puede apreciarse en radiografías), sinovitis proliferativa, participación asimétrica de articulaciones periféricas pequeñas y de tamaño mediano en el esqueleto apendicular, pero no en el axial. Jamieson et al., Invest. Radiol. 20: 324-9 (1985). Además, IL-1 y TN- α parecen estar implicados en CIA, así como en RA. Joosten et al., J. Immunol. 163: 5049-5055 (1999). Los anticuerpos neutralizantes de TNF y por separado, TNFR:Fc, redujeron los síntomas de RA en este modelo (Williams et al., PNAS, 89:9784-9788 (1992); Wooley et al., J. Immunol. 151: 6602-6607 (1993)).

En este modelo para RA, el colágeno de tipo II se purifica de cartílago articular bovino (Miller, Biochemistry 11:4903 (1972)) y se usa para inmunizar ratones (Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2762 (1994)). Los síntomas de la artritis incluyen eritema y/o hinchazón de las extremidades, así como erosiones o defectos en el cartílago y el hueso, como se ha determinado mediante histología. Este modelo ampliamente usado también se describe, por ejemplo, por Holmdahl et al., APMIS 97:575 (1989) y en Current Protocols in Immunology, arriba, unidades 15.5, y en Issekutz et al., Immunology, 88:569 (1996), así como en los ejemplos en el presente documento posteriormente.

Se ha descrito un modelo del asma, en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, la eosinofilia pulmonar y la inflamación se inducen sensibilizando un animal con ovoalbúmina y a continuación exponiendo al animal a la misma proteína administrada mediante aerosol. Varios modelos animales (cobaya, rata, primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópica en seres humanos tras la exposición a antígenos en aerosol. Los modelos murinos tienen muchas de las características del asma humana. Procedimientos adecuados para probar los compuestos de la invención para la actividad y eficacia en el tratamiento del asma se describen por Wolyniec, W. W. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1998) 18:777 y las referencias citadas en su interior.

Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden probarse en modelos animales para enfermedades similares a la psoriasis. La evidencia sugiere una patogénesis de células T para la psoriasis. Los compuestos de la invención pueden probarse en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. et al, Nat. Med. (1997) 3:183, en el que los ratones demuestran lesiones histopatológicas de la piel que se parecen a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de piel humana/ratón scid preparada como se describió por Nickoloff, B. J. et al, Am. J. Path. (1995) 146:580.

Pueden diseñarse modelos de animales recombinantes (transgénicos) introduciendo la porción codificante de los genes identificados en el presente documento en el genoma de animales de interés, usando técnicas convencionales para producir animales transgénicos. Animales que pueden servir como una diana para la manipulación transgénica incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y monos. Técnicas conocidas en el campo para introducir un transgén en tales animales incluyen microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, patente de EE.UU. N.º 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); direccionamiento del gen en células madre embrionarias (Thompson et al., Cell 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]); transferencia génica mediada por esperma (Lavitrano et al., Cell 57, 717-73 [1989]). Para una revisión, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.736.866.

Con el fin de la presente divulgación, animales transgénicos incluyen aquellos que portan el transgén solo en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse ya sea como un único transgén, o en concatámeros, por ejemplo, en tándems cabeza a cabeza o cabeza a cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula particular también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992).

La expresión del transgén en los animales transgénicos puede monitorizarse por técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden usarse análisis de transferencia Southern o de amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. El nivel de expresión del ARNm puede analizarse entonces utilizando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis de transferencia Northern, PCR, o inmunocitoquímica.

Los animales pueden examinarse además para signos de una patología de una enfermedad inmune, por ejemplo, mediante examen histológico para determinar la infiltración de células inmunitarias en tejidos específicos. También pueden realizarse experimentos de bloqueo, en los que los animales transgénicos son tratados con los compuestos de la invención para determinar el grado de la estimulación o inhibición de la proliferación de células T de los compuestos. En estos experimentos, los anticuerpos bloqueantes, que se unen a un polipéptido de la invención, preparados como se describió anteriormente, se administran al animal y se determina el efecto sobre la función inmunitaria.

Alternativamente, pueden construirse animales "inactivados" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en el presente documento, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y el ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en

una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica un polipéptido particular para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido, según técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido particular puede delecionarse o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que puede usarse para monitorizar la integración. Normalmente, varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en los extremos 5' como 3') están incluidas en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se han recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan a continuación en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede implantarse entonces en un animal hembra adoptivo pseudopreñado adecuado, y el embrión se lleva a término para crear un animal "inactivado". La progenie que aloja al ADN recombinado de manera homóloga en sus células germinativas puede identificarse mediante técnicas convencionales y usarse para crear animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de manera homóloga. Los animales inactivados pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

I. Terapia con inmunoadyuvante

En una realización, los compuestos inmunoestimuladores de la invención pueden usarse en terapia con inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores (cáncer). Está ahora bien establecido que las células T reconocen antígenos específicos de tumor humano. Un grupo de antígenos de tumor, codificados por las familias de genes MAGE, BAGE y GAGE, son silenciosos en todos los tejidos normales adultos, pero se expresan en cantidades significativas en los tumores, tales como melanomas, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello y carcinomas de vejiga. DeSmet, C. et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7149. Se ha mostrado que la coestimulación de células T induce la regresión tumoral y una respuesta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. et al., *Nature Medicine* (1997) 3:682; Kwon, E. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 8099; Lynch, D. H. et al, *Nature Medicine* (1997) 3:625; Finn, O. J. y Lotze, M. T., *J. Immunol.* (1998) 21:114. Los datos proporcionados en el presente documento demuestran que la expresión de TIGIT se correlaciona con los infiltrados de células inmunitarias en tumores de cáncer de mama. También se demuestra en el presente documento que TIGIT inhibe la proliferación de DC y otras células inmunitarias y que inhibe la producción de la citocinas proinflamatorias de tales células. Así, la expresión en exceso de TIGIT en las células inmunitarias del infiltrado del tumor puede ser aberrante, ya que la disminución de la actividad de células T en los tumores sería no deseable. Pueden administrarse antagonistas y/o antagonistas de TIGIT de la interacción de señalización de TIGIT-PVR (es decir, antagonistas de PVR) como adyuvantes, solos o junto con un agente regulador del crecimiento, agente citotóxico o agente quimioterapéutico, para estimular la proliferación/activación de células T y una respuesta antitumoral a antígenos del tumor. El agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico puede administrarse en cantidades convencionales usando regímenes de administración conocidos. La actividad inmunoestimuladora por el antagonista de TIGIT y los compuestos antagonistas de la actividad de TIGIT de la invención permite cantidades reducidas de agentes reguladores del crecimiento, citotóxicos o quimioterapéuticos, disminuyendo así posiblemente la toxicidad para el paciente.

J. Ensayos de cribado para fármacos candidatos

Se diseñan ensayos de cribado para fármacos candidatos para identificar compuestos que se unen a o complejan con los polipéptidos codificados por los genes identificados en el presente documento o un fragmento biológicamente activo de los mismos, o interfieren de otro modo con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Tales ensayos de cribado incluyen ensayos susceptibles a cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, que incluyen péptidos, preferentemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpo poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos antiidiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos. Los ensayos pueden realizarse en varios formatos, que incluyen ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica. Todos los ensayos tienen en común en que provocan el contacto del fármaco candidato con un polipéptido codificado por un ácido nucleico identificado en el presente documento en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido codificado por el gen identificado en el presente documento o el fármaco candidato se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se lleva a cabo recubriendo la superficie

sólida con una solución del polipéptido y secando. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido a ser inmovilizado, puede usarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse con una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado.

5 Cuando la reacción es completa, los componentes que no reaccionan se eliminan, por ejemplo, lavando, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente no inmovilizado originalmente porta una marca detectable, la detección de marca inmovilizada en la superficie indica que ha ocurrido la complejación. Donde el componente no inmovilizado originalmente no porta una marca, puede detectarse la complejación, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une de manera específica al complejo inmovilizado.

10 Si el compuesto candidato interacciona con, pero no se une a una proteína particular codificada por un gen identificado en el presente documento, su interacción con esa proteína puede ensayarse mediante métodos bien conocidos para detectar las interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como reticulación, co-inmunoprecipitación y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas.

15 Además, las interacciones proteína interacciones pueden monitorizarse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores [Fields y Song, *Nature (London)* 340, 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] como se describe por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como la levadura GAL4, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión al ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones anteriores (referidos generalmente como el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la cual la proteína diana se fusiona con el dominio que se une al ADN de GAL4, y otra, en la cual las proteínas activantes candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-*lacZ* bajo el control del promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen los polipéptidos interactuantes se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está comercialmente disponible de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear dominios de proteína involucrados en las interacciones específicas de la proteína, así como para señalar restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Con el fin de encontrar compuestos que interfieren con la interacción de un gen identificado en el presente documento y otros componentes intra- o extracelulares que puedan ser probados, normalmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permita la interacción y unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir de control positivo. La unión (formación de complejos) entre el compuesto de prueba y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la(s) reacción (reacciones) de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su componente de reacción.

K. Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad

45 Las composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad incluyen, sin limitación, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y de ribozima, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben o estimulan la función inmunitaria, por ejemplo, la proliferación/activación de células T, liberación de linfocinas o infiltración de células inmunitarias.

50 Por ejemplo, las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan bloqueando directamente la traducción de ARNm hibridándose con un ARNm elegido como diana y previniendo la traducción de proteínas. Cuando se usa ADN antisentido, los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, se prefieren entre aproximadamente -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

55 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. Las ribozimas actúan mediante la hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido por la escisión endonucleolítica. Sitios de escisión de ribozimas específicos, dentro de una posible diana de ARN, pueden identificarse mediante técnicas conocidas. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi, *Current Biology* 4, 469-471 (1994), y la publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

60 Las moléculas de ácido nucleico en la formación de la triple hélice, usadas para inhibir la transcripción, deben ser monocatenarias y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que promueva la formación de la triple hélice mediante las reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 97/33551, arriba.

Estas moléculas pueden identificarse mediante cualquiera o cualquier combinación de los ensayos de cribado tratados anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de selección bien conocida para aquellos expertos en la materia.

5 L. Anticuerpos anti-TIGIT

La presente divulgación proporciona además anticuerpos anti-TIGIT. Anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados. Se entenderá por un experto habitual en la materia que la divulgación también proporciona anticuerpos contra otros polipéptidos (es decir, anticuerpos anti-PVR) y que cualquiera de la descripción en el presente documento que esté dirigida específicamente al método de creación, producción, variedades, uso u otros aspectos de los anticuerpos anti-TIGIT, también será aplicable a anticuerpos específicos para otros polipéptidos que no son de TIGIT.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-TIGIT pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto. Pueden crearse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante, y si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de TIGIT o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de la tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorimonicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin excesiva experimentación

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-TIGIT pueden, alternativamente, ser anticuerpo monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante normalmente incluirá el polipéptido de TIGIT o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, o bien se usan linfocitos de la sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o bien se usan células del bazo o de los ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan a continuación con una línea celular immortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas celulares immortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células immortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Líneas celulares immortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan expresión estable de alto nivel del anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Líneas celulares immortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California, y de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede entonces ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivando mediante métodos convencionales [Goding, arriba]. El medio de cultivo adecuado para este fin incluye, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en los vectores de expresión, que son entonces transfectados en células hospedadoras, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos, en lugar de las secuencias murinas homólogas [patente de EE.UU. N.º 4.816.567; Morrison et al., arriba] o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina, de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Métodos de preparación de anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método involucra la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc para prevenir que la cadena pesada se reticule. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes están sustituidos con otro resto de aminoácido o son delecionados para prevenir la reticulación.

También son adecuados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede llevarse a cabo usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-TIGIT de la divulgación pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de la región estructural importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos un dominio variable, y normalmente dos, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones CDR con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos restos no humanos de aminoácidos se denominan frecuentemente en lo sucesivo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1998)] sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y

posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando varias técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Similarmente, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo un locus de la inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, en los que los genes de la inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o completamente inactivados. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece estrechamente a aquella observada en seres humanos en todos los aspectos, que incluyen la reordenación de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos también pueden ser madurados por afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos, como se describió anteriormente. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 o 30 veces superior a la del anticuerpo inicial (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado.

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por TIGIT, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferentemente, por una proteína o receptor o subunidad de receptor de la superficie celular.

Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza normalmente por etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte de la región C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan et al., Science 229:81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante

reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Fragmentos Fab' pueden ser directamente recuperados de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Como un ejemplo no limitante, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Véase, por ejemplo, Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferente en un polipéptido de TIGIT dado en el presente documento. Alternativamente, un brazo del polipéptido anti-TIGIT puede combinarse con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito, tal como una molécula del receptor de células T (por ejemplo CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores de Fc para la IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el polipéptido de TIGIT particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar los agentes citotóxicos en la células que expresan un polipéptido de TIGIT particular. Estos anticuerpos poseen un brazo que se une a TIGIT y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido de TIGIT y se une además al factor de tejido (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugado también están dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas [patente de EE.UU. N.º 4.676.980] y para el tratamiento de infección por el VIH [documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los desvelados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.676.980.

6. Ingeniería de la función efectora

Puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de forma que se potencie, por ejemplo, la efectividad del anticuerpo en tratar cáncer. Por ejemplo, el (los) resto(s) de cisteína puede(n) ser introducido(s) en la región Fc, permitiendo así la formación del enlace disulfuro entre cadenas en esta región. Por tanto, el anticuerpo homodimérico generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) elevadas. Véase Caron et al., J. Exp Med, 176:1191-1195(1992) y Shopes, J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, puede manipularse un anticuerpo, teniendo regiones Fc duales y así puede tener lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

7. Inmunoconjugados

La divulgación también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

La divulgación también proporciona inmunoconjugados (referidos de manera indistinta como "conjugados del anticuerpo-fármaco", o "ADC"), que comprenden un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han usado inmunoconjugados para la administración local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben el crecimiento o la proliferación de células en el tratamiento de cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; patente de EE.UU. N.º 4.975.278). Los inmunoconjugados permiten la administración elegida como diana de un resto de fármaco a un tumor, y la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de los fármacos sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin et al., Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera et al., eds) pp. 475-506). Se ha informado de tanto anticuerpos policlonales como de anticuerpos monoclonales útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986), arriba). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler et al. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de conector de tiourea (Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. N.º 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el conector de disulfuro SPP al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está avanzando a ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) ligado al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente). Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcinas, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 d octubre de 1993. Está disponible varios radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando varios agentes de

acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta et al. (1987) Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

a. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N.º 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. N.º 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos de fármaco maitansinoide son restos de fármaco atractivos en los conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para prepararse mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos de la fermentación, (ii) susceptibles a la derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de conectores que no son de disulfuro a los anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra varias líneas celulares de tumor.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un conector de disulfuro con el anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan ligando químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en el presente documento. Maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en la patente de EE.UU. N.º 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) y la solicitud de patente de EE.UU. N.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente conector SMCC pueden prepararse como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o lábiles de esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter. Grupos de enlace adicionales se describen y ejemplifican en el presente

documento. Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El conector puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en posición la C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

b. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (patentes de EE.UU. N.º 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica del microtúbulo, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolostatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al extremo N DE y DF, desvelados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US N.º de Serie 10/983.340, presentada el 5 de Noviembre del 2004.

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptido pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el método de síntesis en fase líquida (véase, E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), que es bien conocido en el campo de la química peptídica. Los restos de fármaco de auristatina/dolostatina pueden prepararse según los métodos de: los documentos US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US N.º de serie 10/983.340, presentada el 5 de noviembre (que desvela, por ejemplo, conectores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con los conectores).

c. Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

d. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU. 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina,

crotona, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecnos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

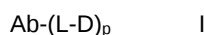
Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse por un resto de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil de ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. N.º 5.208.020).

Los compuestos contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de conector cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

e. Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante un conector (L). El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de conector bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de conector bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Métodos adicionales de preparación del ADC se describen en el presente documento.



El conector puede estar compuesto de uno o más componentes conectores. Componentes conectores a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil) aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Componentes conectores adicionales son conocidos en la técnica y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US. N.º de serie 10/983.340, presentada el 5 de noviembre del 2004.

En algunas realizaciones, el conector puede comprender restos de aminoácidos. Componentes conectores de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos a

modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Restos de aminoácidos que comprenden un componente conector de aminoácidos incluyen aquellos que se producen naturalmente, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no existen de forma natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse componentes conectores de aminoácidos y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática mediante enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos). Los conjugados de anticuerpo-fármaco también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de conector o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de conector o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio puede dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo conector.

Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

8. Inmunoliposomas

Los anticuerpos desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); y las patentes de EE.UU. N.º 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la patente de EE.UU. N.º 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:1286-288 (1982) por una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

M. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas activas de la divulgación (por ejemplo, polipéptidos de TIGIT, anticuerpos anti-TIGIT, variantes de cada uno, agonistas de TIGIT, antagonistas de TIGIT, agonistas de PVR y antagonistas de PVR), así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado desvelados anteriormente, pueden administrarse para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad, en la forma de composiciones farmacéuticas.

Las formulaciones terapéuticas para una molécula activa, por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo de la invención, se preparan para almacenamiento mezclando la molécula activa que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los compuestos identificados mediante los ensayos de cribado desvelados en el presente documento pueden formularse de una manera análoga, usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

También pueden usarse lipofecciones o liposomas para administrar la molécula activa en las células. Donde se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que retienen la capacidad para unirse a la secuencia de proteínas diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Las moléculas activas también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida de las moléculas activas. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden considerarse estrategias racionales para la estabilización, dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tiodisulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

N. Métodos de tratamiento

Se contempla que los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos activos de la presente divulgación pueden usarse para tratar varias enfermedades y afecciones relacionadas con la inmunidad, tales como enfermedades mediadas por células T, que incluyen aquellas caracterizadas por la infiltración de células inflamatorias en un tejido, estimulación de la proliferación de células T, inhibición de la proliferación de células T, producción de citocinas aumentada o disminuida, y/o permeabilidad vascular aumentada o disminuida o la inhibición de la misma. Dadas las divulgaciones en el presente documento de la función de TIGIT en modular la proliferación de células T y la producción de citocinas, la modulación de la expresión y/o actividad de TIGIT puede ser eficaz en prevenir y/o tratar estas enfermedades.

Afecciones o trastornos a modo de ejemplo que van a tratarse con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por la inmunidad), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por la inmunidad (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepato biliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunitarias o mediadas con la inmunidad que incluyen enfermedades ampollosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes que incluyen rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped.

En lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos autorreactivos a las proteínas/tejidos autógenos y la posterior generación de inflamación mediada por la inmunidad. Los anticuerpos median o bien directa o bien indirectamente en la lesión de tejido. Aunque no se ha mostrado que los linfocitos T estén involucrados directamente en el daño de tejido, se requieren linfocitos T para el desarrollo de anticuerpos autorreactivos. La génesis de la enfermedad es, por lo tanto, dependiente de linfocitos T. Múltiples órganos y sistemas son clínicamente afectados, incluyendo el riñón, pulmón, sistema musculoesquelético, mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tubo gastrointestinal, médula ósea y sangre.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria sistémica crónica que involucra principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones, con lesión resultante del cartílago articular. La patogénesis es dependiente de linfocitos T y está asociada con la producción de factores reumatoides, autoanticuerpos dirigidos contra IgG autóloga, con la formación resultante de complejos inmunitarios que alcanzan altos niveles en el líquido sinovial y la sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir el marcado infiltrado de linfocitos y monocitos en el sinovio y cambios sinoviales marcados posteriores; el espacio articular/líquido sinovial es infiltrado por células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, frecuentemente en un patrón simétrico. Sin embargo, también se produce enfermedad extrarticular en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extrarticulares con la enfermedad de las articulaciones progresiva en curso y las lesiones típicas de fibrosis pulmonar, vasculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extrarticular es el llamado síndrome de Felty, que aparece tarde en el transcurso de la enfermedad de RA, algunas veces después de que la enfermedad de las articulaciones se haya vuelto quiescente, e involucra la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esta puede ir acompañada por vasculitis en múltiples órganos con la formación de infartos, úlceras de la piel y gangrena. Los pacientes también desarrollan frecuentemente nódulos reumáticos en el tejido del subcutis que recubre las articulaciones afectadas; la etapa tardía de los nódulos tiene centros necróticos rodeados por un infiltrado de células inflamatorias mezcladas. Otras manifestaciones que pueden ocurrir en la RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza frecuentemente con menos de 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que son positivos al factor reumatoide son clasificados como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser grave y es normalmente destructiva y conduce a anquilosis de las articulaciones y crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica. Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto génico HLA-B27. Los trastornos incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis asociada con psoriasis, espondiloartropatía de aparición juvenil y

espondiloartropatía no diferenciada. Las características distintivas incluyen sacroileítis con o sin espondilitis; artritis asimétrica inflamatoria; asociación con HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B del MHC de clase I); inflamación ocular y ausencia de autoanticuerpos asociada a otra enfermedad reumatoide. La célula más implicada como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito T CD8⁺, una célula que se dirige al antígeno presentado por las moléculas del MHC de clase I. Las células T CD8⁺ pueden reaccionar contra el alelo del MHC de clase I HLA-B27 como si fuera un péptido extraño expresado por las moléculas del MHC de clase I. Se ha supuesto que un epítipo de HLA-B27 puede imitar un epítipo antigénico bacteriano u otro epítipo antigénico microbiano, e inducir, por lo tanto, una respuesta de células T CD8⁺. Como se muestra en el presente documento, TIGIT se expresa en células T CD8⁺, y la modulación de la expresión y/o actividad de TIGIT en esas células puede modular los síntomas de y/o prevenir esta enfermedad.

La esclerosis sistémica (esclerodermia) tiene una etiología desconocida. Una marca característica de la enfermedad es la induración de la piel; probablemente esto se induce por un proceso inflamatorio activo. La esclerodermia puede ser localizada o sistémica; las lesiones vasculares son comunes y la lesión de las células endoteliales en la microvasculatura es un evento temprano e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica; la lesión vascular puede estar mediada por la inmunidad. Una base inmunológica está implicada por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. ICAM-1 frecuentemente está regulado por incremento en la superficie celular de fibroblastos en las lesiones de la piel, sugiriendo que la interacción de células T con estas células puede tener una función en la patogénesis de la enfermedad. Otros órganos involucrados incluyen: el tubo gastrointestinal: atrofia de músculo liso y fibrosis que produce peristalsis/motilidad anormal; riñón: proliferación de la íntima subendotelial concéntrica que afecta las arterias arqueadas e interlobulares pequeñas con circulación sanguínea cortical renal reducida resultante, produce proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

Las miopatías inflamatorias idiopáticas, que incluyen dermatomiositis, polimiositis y otras, son trastornos de la inflamación crónica del músculo de etiología desconocida que producen debilidad muscular. La lesión/inflamación muscular es frecuentemente simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos están asociados con la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de la miositis están dirigidos contra, e inhiben la función de los componentes, proteínas y ARN, involucrados en la síntesis de proteínas.

El síndrome de Sjögren se debe a la inflamación mediada por la inmunidad y la posterior destrucción funcional de las glándulas lagrimales y las glándulas salivales. La enfermedad puede asociarse a, o ir acompañada de, enfermedades inflamatorias del tejido conectivo. La enfermedad está asociada con la producción de autoanticuerpos contra los antígenos Ro y La, ambos de los cuales son complejos pequeños de ARN-proteína. Las lesiones producen queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial, y púrpura palpable.

La vasculitis sistémica son enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y el posterior daño a vasos sanguíneos, que produce isquemia/necrosis/degeneración a los tejidos suministrados por los vasos afectados y la disfunción del órgano final eventual en algunos casos. Las vasculitis también pueden producirse como una lesión secundaria o secuela de otras enfermedades inflamatorias mediadas por la inmunidad, tales como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades también asociadas a la formación de complejos inmunitarios. Enfermedades en el grupo de la vasculitis sistémica primaria incluyen: vasculitis necrotizante sistémica: poliarteritis nodosa, angéitis alérgica y granulomatosis, poliangeítis; granulomatosis de Wegener, granulomatosis linfomatoide; y arteritis de células gigantes. Las vasculitis misceláneas incluyen: síndrome de los ganglio linfático mucocutáneos (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis del CNS aislada, enfermedad de Behet, tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis necrotizante cutánea. Se cree que el mecanismo patógeno de la mayoría de los tipos de vasculitis enumerados es principalmente debido a la deposición de complejos de inmunoglobulina en la pared del vaso y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria, ya sea mediante ADCC, activación del complemento o ambas.

La sarcoidosis es una afección de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido en el cuerpo; la participación del pulmón es muy común. La patogénesis involucra la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con secuelas crónicas posteriores resultantes de la liberación de productos activos localmente y sistémicamente liberados por estos tipos de células.

La anemia hemolítica autoinmune, incluyendo anemia hemolítica autoinmune, pancitopenia inmune y hemoglobinuria nocturna paroxísmica, es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otros glóbulos sanguíneos, que también incluyen plaquetas), y es un reflejo de la eliminación de aquellas células recubiertas por anticuerpos mediante la lisis mediada por el complemento y/o mecanismos mediados por el ADCC/receptor de Fc.

En la trombocitopenia autoinmune, que incluye púrpura trombocitopénica y trombocitopenia mediada por la inmunidad en otro entorno clínico, la destrucción/eliminación de plaquetas se produce como resultado de o bien un

anticuerpo, o bien el complemento que se une a plaquetas, y la posterior eliminación mediante la lisis del complemento, mecanismos mediados por ADCC o por receptor de Fc.

La tiroiditis, que incluyen enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil y tiroiditis atrófica, son el resultado de una respuesta autoinmunitaria contra los antígenos de la tiroides, con producción de anticuerpos que reacciona con proteínas presentes en, y frecuentemente específicas para la glándula tiroides. Existen modelos experimentales que incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de animales con cualquier tiroglobulina, antígeno microsomal tiroideo (peroxidasa tiroidea).

La diabetes mellitus de tipo I o la diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmunitaria de las células β de los islotes pancreáticos; esta destrucción está mediada por los auto-anticuerpos y las células T autorreactivas. Los anticuerpos para la insulina o el receptor de la insulina también pueden producir el fenotipo de falta de sensibilidad a la insulina.

Las enfermedades renales mediadas por la inmunidad, que incluyen glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de una lesión mediada por anticuerpos o linfocitos T al tejido renal, ya sea directamente como resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o células T contra los antígenos renales, o indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunitarios en el riñón, que son reactivos contra otros antígenos no renales. Así, otras enfermedades mediadas por la inmunidad que producen la formación de complejos inmunitarios también pueden inducir la enfermedad renal mediada por la inmunidad como secuela indirecta. Tanto los mecanismos inmunitarios directos como indirectos producen una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en tejidos renales con alteración de la función del órgano resultante y en algunos casos progresión a insuficiencia renal. Tanto los mecanismos inmunitarios humorales como celulares pueden estar implicados en la patogénesis de lesiones.

Se cree que las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nervioso central y periférico, que incluyen esclerosis múltiple; polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré; y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, tienen una base autoinmunitaria y producen la desmielinización de los nervios como resultado del daño causado a los oligodendrocitos o a la mielina directamente. En la MS hay evidencia que sugiere que la inducción y progresión de la enfermedad depende de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de linfocitos T y que tiene o bien una evolución de recaída-remisión o bien una evolución progresiva crónica. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, la predisposición genética, el entorno y la autoinmunidad contribuyen todos. Las lesiones contienen infiltrados de células microgliales mediadas predominantemente por linfocitos T, y macrófagos infiltrantes; los linfocitos T CD4⁺ son el tipo de célula predominante en las lesiones. No se conoce el mecanismo de muerte celular de los oligodendrocitos y la posterior desmielinización, pero probablemente es accionado por los linfocitos T.

La enfermedad inflamatoria y fibrótica del pulmón, que incluye neumonías eosinofílicas; fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, pueden involucrar una respuesta inflamatoria inmunitaria desregulada. La inhibición de esa respuesta sería de beneficio terapéutico.

La enfermedad de la piel autoinmunitaria o mediada por la inmunidad, que incluye enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, están mediadas por autoanticuerpos, la génesis de las cuales es dependiente de linfocitos T.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células que procesan antígenos, y algunos neutrófilos.

Las enfermedades alérgicas, que incluyen asma, rinitis alérgica; dermatitis atópica; hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, son dependientes de linfocitos T. Estas enfermedades están predominantemente mediadas por la inflamación inducida por linfocitos T, inflamación mediada por IgE, o una combinación de ambas.

Las enfermedades asociadas al trasplante, que incluyen rechazo de injerto y enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), son dependientes de linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T es alivante.

Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria tienen beneficio son las enfermedades infecciosas que incluyen, pero no se limitan a, infección viral (que incluye, pero no se limita a, SIDA, hepatitis A, B, C, D, E y herpes), infección bacteriana, infecciones fúngicas e infecciones protozoicas y parasitarias (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan el MLR pueden utilizarse terapéuticamente para potenciar la respuesta inmunitaria a agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas), que estimulan el MLR pueden utilizarse terapéuticamente para potenciar la respuesta inmunitaria para condiciones de inmunodeficiencia heredada, adquirida, infecciosa inducida (como en la infección por el VIH), o iatrogénica (es decir, de la quimioterapia) y neoplasia.

Se ha demostrado que algunos pacientes humanos con cáncer desarrollan una respuesta de anticuerpos y/o

linfocitos T a los antígenos en células neoplásicas. También se ha mostrado que en los modelos animales de neoplasia, que el potenciamiento de la respuesta inmunitaria puede producir rechazo o regresión de esa neoplasia particular. Las moléculas que potencian la respuesta de linfocitos T en MLR tienen utilidad *in vivo* en potencian la respuesta inmunitaria contra la neoplasia. Las moléculas que potencian la respuesta proliferativa de linfocitos T en el MLR (o agonistas o anticuerpos de molécula pequeña que afectan el mismo receptor de una manera agonística), pueden usarse terapéuticamente para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta de linfocitos en el MLR (es decir, TIGIT), también funcionan *in vivo* durante la neoplasia para suprimir la respuesta inmunitaria a una neoplasia; tales moléculas pueden o bien ser expresadas por las células neoplásicas mismas o bien su expresión puede ser inducida por la neoplasia en otras células. El antagonismo de tales moléculas inhibitoras (ya sea con un anticuerpo, agonistas de molécula pequeña u otros medios) potencia el rechazo del tumor mediado por la inmunidad.

Además, la inhibición de las moléculas con propiedades proinflamatorias puede tener un beneficio terapéutico en la lesión por reperusión; accidente cerebrovascular; infarto de miocardio; aterosclerosis; lesión pulmonar aguda; choque hemorrágico; quemadura; septicemia/choque séptico; necrosis tubular aguda; endometriosis; enfermedad degenerativa de las articulaciones y pancreatitis.

Los compuestos de la presente divulgación, por ejemplo, polipéptidos, moléculas pequeñas o anticuerpos, se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, según métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante la infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación (intranasal, intrapulmonar). La administración intravenosa, subcutánea o inhalada de los polipéptidos y anticuerpos son las más comúnmente usadas.

En la terapia con inmunoadyuvante, pueden combinarse otras pautas terapéuticas, tales como la administración de un agente antineoplásico, con la administración de proteínas, anticuerpos o compuestos de la presente invención. Por ejemplo, el paciente que va a tratarse con, por ejemplo, un inmunoadyuvante de la invención también puede recibir un agente antineoplásico (agente quimioterapéutico) o radioterapia. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico habitual. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir la administración del inmunoadyuvante o puede proporcionarse de manera simultánea con el mismo. Además, pueden administrarse un compuesto antiestrógeno, tal como tamoxifeno, o un agente antiprogesterona, tal como onapristona (véase el documento EP 616812), en dosificaciones conocidas para tales moléculas.

También puede desearse administrar anticuerpos contra otra enfermedad inmunitaria asociada o antígenos asociados a tumor, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente o además, dos o más anticuerpos que se unen a los mismos o dos o más antígenos diferentes desvelados en el presente documento pueden coadministrarse al paciente. Algunas veces también puede ser beneficioso administrar una o más citocinas al paciente. Por ejemplo, en una realización, los polipéptidos de TIGIT se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse primero, seguido de un polipéptido de TIGIT. Sin embargo, también está contemplada la administración simultánea o administración primera. Dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas actualmente usadas y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y, por ejemplo, el polipéptido de TIGIT.

Para el tratamiento o reducción en la gravedad de la enfermedad relacionada con la inmunidad, la dosificación apropiada de un compuesto de la invención dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se definió anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historia clínica del paciente y respuesta al compuesto, y el criterio del médico adjunto. El compuesto puede administrarse adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) del polipéptido o anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

O. Artículos de fabricación

En otra realización de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene los materiales (por ejemplo, que comprende una molécula de TIGIT, un agonista de TIGIT, un antagonista de TIGIT, un agonista de PVR, o un antagonista de PVR) útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente e instrucciones. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para diagnosticar o tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja para inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es normalmente un polipéptido o un anticuerpo de la invención. Las instrucciones o etiqueta en, o asociada con el recipiente, indica que la composición se usa para diagnosticar o tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

P. Diagnóstico y pronóstico de la enfermedad relacionada con la inmunidad

Las proteínas de la superficie celular, tales como las proteínas que se expresan en exceso en ciertas enfermedades relacionadas con la inmunidad (es decir, TIGIT), son excelentes agentes moduladores para fármacos candidatos o el tratamiento de enfermedades. Las mismas proteínas junto con las proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en estados de la enfermedad relacionada con la inmunidad encuentran un uso adicional en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los productos de proteína de los genes amplificados en artritis reumatoide u otras enfermedades relacionadas con la inmunidad pueden usarse como diagnósticos o pronósticos.

Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, que incluyen fragmentos de anticuerpo, para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por genes amplificados o expresados en exceso ("productos de gen marcador"). El anticuerpo está equipado preferentemente con una marca detectable, por ejemplo, fluorescente, y la unión puede monitorizarse mediante microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la técnica. Estas técnicas son particularmente adecuadas si el gen expresado en exceso codifica una proteína de la superficie celular. Tales ensayos de unión se realizan esencialmente como se describió anteriormente.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos de gen marcador puede realizarse, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para este fin, se retira un espécimen histológico del paciente, y se aplica un anticuerpo marcado al mismo, preferentemente cubriendo el anticuerpo sobre una muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto de gen marcador en el tejido examinado. Será evidente para aquellos expertos en la materia que están fácilmente disponibles una amplia variedad de métodos histológicos para la detección *in situ*. Otras técnicas también son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, la citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS).

Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos únicamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: Caracterización adicional de TIGIT

Se ha identificado previamente TIGIT (véase, por ejemplo, la publicación de la patente de EE.UU. N.º US20040121370) en estrategias de búsqueda del genoma completo dirigidas a genes expresados específicamente por células inmunitarias que tienen una estructura de dominio que consiste de dominios de Ig extracelulares, una región transmembranaria de tipo uno y un motivo(s) de activación o inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor intracelular (ITAM/ITIM) (Abbas, A.R. et al. *Genes Immun* 6, 319-31 (2005); Burshtyn, D.N. et al., *J Biol Chem* 272, 13066-72 (1997); Kashiwada, M. et al., *J Immunol* 167, 6382-7 (2001)). La secuencia de TIGIT humana y los homólogos de ratón (enviados a Genbank), mono rhesus (N.º de acceso de Genbank XP_001107698) y perro (N.º de acceso de Genbank XP_545108) se muestran en la Figura 1. Para dilucidar adicionalmente la función de TIGIT en la función inmunitaria, se realizó una búsqueda de la homología que identificó el dominio de Ig de TIGIT como similar a los dominios de IgV del extremo N de la proteína del receptor del virus de la poliomielitis (PVR) y las proteínas 1-4 similares al PVR (PVRL1-4), así como los dominios de IgV del extremo N de CD96 y CD226 (véanse las Figuras 2A-2B). El alineamiento de estas proteínas mostró que los restos altamente conservados que definen el dominio de IgV canónico se conservaron en TIGIT, y sugirió además que aquellas ocho proteínas podían comprender un subconjunto relacionado de la familia de Ig. Los restos del marco V conservados han mostrado ser importantes para establecer el pliegue del marco V (Wiesmann, C. & de Vos, A.M. *Cell Mol Life Sci* 58, 748-59 (2001)). Se identificaron varios restos cerca del pliegue del marco V que estaban conservados entre las ocho

proteínas, incluyendo cuatro restos absolutamente conservados (A^{67} , G^{74} , P^{114} y G^{116}), y cinco restos conservados ($V/I/L^{54}$, S/T^{55} , Q^{55} , T^{112} y F/Y^{113}), que comprenden tres submotivos ($V/I/L^{54}$ - S/T^{55} - Q^{55}), (A^{67} - $X(6)$ - G^{74}) y (T^{112} - F/Y^{113} - P^{114} - $X-G^{116}$). En el caso de TIGIT, estos submotivos parecen estar conservados a través de las especies (véase la Figura 1), y no están presentes en otras proteínas que contienen el dominio de IgV descrito actualmente. Estos

restos conservados pueden definir una clase de proteínas similares a PVR, que incluyen PVR, proteínas 1-4 similares a PVR, CD96, CD226 y TIGIT.

PVRL1-4 y PVR comparten una arquitectura del dominio común (IgV-IgC-IgV), mientras que CD226 y CD96 carecen del dominio de IgV proximal a la membrana. TIGIT es el miembro más económico de la familia, que consiste de un único dominio de IgV. Los segmentos intracelulares de estas ocho proteínas muestran solo una similitud limitada entre sí, fuera del motivo que se une a la afadina compartido entre PVRL1-3. Basándose en la estructura cristalina del dominio de IgV relacionado de NECL-1 (Dong, X. et al., J Biol Chem 281, 10610-7 (2006)), se predice que el primer y tercer motivos se encuentran en los bucles de la horquilla entre las hebras beta B y C y F y G, respectivamente. Estos dos bucles son adyacentes entre sí en un extremo del pliegue de IgV. El segundo motivo comprende las hebras beta C' y C'' que están involucradas en formar parte de la interfase homodimérica para NECL-1. Así, los motivos de secuencia observados en la familia TIGIT/PVR pueden desempeñar una función en las interacciones homo- y heterotípicas específicas observadas entre miembros de la familia de PVR. El PVR ha sido previamente caracterizado como una proteína similar a la nectina, pero los análisis de secuencia anteriores sugieren que, en su lugar, debe considerarse un miembro de la familia del PVR, estando ciertas nectinas (es decir, PVRL1-4) clasificadas como una rama de la familia del PVR.

Ejemplo 2: Identificación del ligando del PVR

Se identificaron los posibles componentes de unión para la TIGIT seleccionando una biblioteca grande de proteínas secretadas para buscar proteínas que se unen a TIGIT inmovilizada. Brevemente, se construyó una fusión Fc de TIGIT (TIGIT-Fc) clonando los aminoácidos 1-138 de TIGIT humana en un vector que precede inmediatamente a la región Fc de la IgG1 humana (TIGIT-Fc). También se construyó una versión alterna de TIGIT-Fc en la que se anuló la unión de FcγR, introduciendo dos mutaciones en la cola de Fc de TIGIT-Fc en D256A y N297A, usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio convencionales (TIGIT-Fc-DANA). La proteína de fusión resultante se expresó transitoriamente en y se purificó de células CHO usando técnicas de cromatografía de afinidad convencional. Se cribó una biblioteca de proteínas secretadas individuales fusionadas a marcas de hexahistidina o Fc para la unión a TIGIT-Fc usando el sistema Octet (ForteBio). Las proteínas se probaron para la unión en HBS-P (Hepes 10 mM, pH 7,4; NaCl 0,15 M; 0,005 % de tensioactivo P20). Se cargó TIGIT-Fc o una proteína de fusión de Fc de control en biosensores de Fc antihumanos para la saturación. Los biosensores se lavaron en tampón (30 segundos), se colocaron en pocillos que contenían 5 µg/ml de proteína durante tres minutos, y se lavaron nuevamente durante 30 segundos. Los sensores se recargaron y lavaron después de cada dos ciclos de unión. La unión se indicó como un aumento en el nivel de respuesta superior a 0,2 nm, y la especificidad se determinó mediante la comparación con una proteína de fusión Fc de control. Se identificó una única proteína que se une a TIGIT en más de 1000 proteínas analizadas. Como se muestra en la Figura 3, una proteína de fusión de TIGIT-Fc inmovilizada en un biosensor de Fc antihumano interaccionó específicamente con una proteína de fusión de PVR-Fc. La especificidad de esta interacción se apoyó por la falta de interacción específica de TIGIT con cualquier otra proteína en la biblioteca, y además por el hecho de que los biosensores cargados con otras proteínas que contienen el dominio de Ig no provocaron una respuesta a PVR.

Debido a que se ha conocido previamente que PVR, PVRL1-4, CD96 y CD226 interaccionan entre sí (He, Y. et al., J Virol 77, 4827-35 (2003); Satoh-Horikawa, K. et al., J Biol Chem 275, 10291-9 (2000); Bottino, C. et al. J Exp Med 198, 557-67 (2003); Fuchs, A. et al., J Immunol 172, 3994-8 (2004); Reymond, N. et al., J Exp Med 199, 1331-41 (2004)), la interacción de TIGIT con cada una de estas proteínas se evaluó usando el sistema de biosensores descrito anteriormente. Se construyeron proteínas de fusión de Fc y purificaron para cada una de las proteínas que iban a probarse, como se describió anteriormente para TIGIT-Fc. Específicamente, los aminoácidos 1-343 de la proteína 1 similar al PVR (PVRL1), los aminoácidos 1-360 de la proteína 2 similar al PVR (PVRL2), los aminoácidos 1-411 de la proteína 3 similar al PVR (PVRL3), los aminoácidos 1-349 de la proteína 4 similar al PVR (PVRL4), los aminoácidos 1-259 de CD226, o los aminoácidos 1-500 de CD96, se fusionaron inmediatamente antes de la región Fc de la IgG1 humana. Las proteínas de fusión de Fc resultantes se probaron para la unión a TIGIT-Fc. PVR-Fc, PVRL3-Fc y PVRL2-Fc se unieron a TIGIT-Fc, mientras que CD226-Fc, CD96-Fc, PVRL1-Fc y PVRL4-Fc no se unieron a TIGIT-Fc (Figura 4A). De los tres ligantes observados, PVR-Fc mostró la mayor unión a TIGIT-Fc, seguido por PVRL3-Fc, y la menor cantidad de unión de los tres a TIGIT-Fc se observó con PVRL2-Fc.

También se realizaron análisis FACS para evaluar la unión de las fusiones de Fc al miembro de la familia del PVR construidas anteriormente para células CHO que expresan TIGIT. Las proteínas de fusión de Fc se biotinilaron mediante el acoplamiento de amina usando NHS-PEO4-Biotina (Pierce) en PBS. Se detectó la unión de biotina-ligandos usando estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Caltag). Se conjugó anticuerpo monoclonal de ratón a una marca gD (Genentech) con AlexaFluor 647 (Invitrogen). Los anticuerpos se conjugaron con marcas de flúor apropiadas usando técnicas convencionales. Las células se tiñeron según instrucciones del fabricante. Antes de la tinción, las células se bloquearon con sueros apropiados o IgG purificada. La adquisición se realizó en un FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizó con el programa JoFlo (Tree Star, Inc.). La dispersión hacia adelante y

lateral activó células viables. Los resultados se exponen en las Figuras 4B-1 a 4B-6, y muestran que el patrón de unión observado en el ensayo del biosensor artificial fue el mismo que el observado en un entorno más fisiológico en la superficie celular.

Para determinar la fuerza de las interacciones de unión de PVR-TIGIT, PVRL2-TIGIT y PVRL3-TIGIT, se realizaron ensayos de unión directa al radioligando usando células CHO transfectadas establemente con aquellas proteínas. Para la expresión superficial de células CHO, se clonaron ADN de longitud completa de TIGIT, PVR, PVRL2, PVRL3, CD226 y CD96 en un vector inmediatamente después de una secuencia señal de gD (MGGTAARLGAVILFWIVGLHGVRG (SEQ ID NO: 19)) y la marca de gD (KYALADASLKMADPNRFRGKDLPLV (SEQ ID NO: 20)). Los plásmidos se transfectaron en células CHO usando Lipofectamine LTX (Invitrogen). La expresión de las proteínas marcadas con gD se verificó mediante citometría de flujo usando el conjugado Alexa-647-anti-gD. Las líneas celulares transfectadas establemente se clasificaron dos veces mediante FACS para pureza antes de uso. Se yodaron (125 I) las proteínas de fusión de Fc construidas como se describió anteriormente usando el método lodogen. Se llevaron a cabo estudios de unión en transfectantes estables por triplicado con el ligando yodado 0,1-3 nM. Las proteínas yodadas se incubaron con 1×10^5 - 2×10^5 células en presencia de una serie de diluciones de proteína competidora no marcada (25 pM-5 μ M) durante cuatro horas a 4 °C. Las suspensiones celulares se recogieron en membranas de nitrocelulosa (Millipore) y se lavaron de manera extensa. Se contaron los filtros secos y se realizaron análisis de Scatchard usando el programa NewLigand 1.05 (Genentech) para determinar la afinidad de unión (K_d).

Las Figuras 5A y 5B muestran la unión de la proteína TIGIT-Fc radiomarcada a las células CHO que expresan PVR. La K_d promedio para la interacción TIGIT-Fc-PVR en cuatro experimentos fue de 3,15 nM. La Tabla 6 muestra los resultados de todos los análisis en forma tabular.

Tabla 6. Unión celular de las proteínas de la familia del PVR. Los receptores se expresaron en células CHO, y todos los ligandos fueron construcciones de Fc. La MFI se determinó mediante citometría de flujo con ligandos de Fc biotinilados, después de activar las células positivas al receptor. La afinidad de unión (K_d) se determinó mediante un ensayo de unión del radioligando por competencia. La K_d se indica (nM) y es el valor promedio de al menos 3 ensayos independientes, excepto donde se indica (*).

Receptor	Ligando										
	PVR		TIGIT		PVRL2		PVRL3		CD226		CD96
	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI
PVR	-	-	+++	1,02	-	-	+++	70,8	+++	114*	+++
TIGIT	++++	3,15	-	-	++	&	+++	38,9	-	-	-
PVRL2	-	-	-	-	-	-	++	14-30	-	-	-
PVRL3	++	-	++	-	+++	3-13	-	-	-	-	-
CD226	+++	119	-	-	+	&	-	-	-	-	-
CD96	+++	37,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
++++ MFI>5000 +++ MFI=1000-4999 ++ MFI=100-999 + MFI<100 Sin unión & Unión específica, pero K_d no dilucidada * promedio de dos ensayos											

La interacción de TIGIT con el PVR presentó la afinidad más alta (K_d = 1-3 nM), mientras que la afinidad de TIGIT que se une a PVRL3 fue aproximadamente 10-30 veces menor (K_d = 38,9 nM) (véase la Tabla 6). Debido al mal ajuste de la curva en el ensayo del radioligando, la constante de unión para la interacción PVRL2-TIGIT no pudo determinarse, pero se observó unión específica, sin embargo, y fue según los datos de FACS descritos anteriormente, que muestran una unión modesta de PVRL2-Fc a CHO-TIGIT, y refuerzan además el hallazgo de que la unión entre PVRL2 y TIGIT es una interacción de baja afinidad. La proteína de fusión de Fc yodada (ligando) se unió a las células CHO que expresan el receptor a la concentración indicada, y compitieron con diluciones en serie de 10 veces de CD226-Fc (8 μ M en CHO-TIGIT; 5 μ M en CHO-PVR), TIGIT-Fc (2 μ M en CHO-PVR; 6 μ M en CHO-CD226 y CHO-CD96). La unión no específica se determinó usando un exceso de 2000 veces del ligando frío y se restó de la unión total. Los estudios de competencia mostraron que TIGIT bloqueó eficazmente la interacción del PVR a sus otros co-receptores CD226 y CD96, mientras que CD226 fue un inhibidor menos eficaz de la interacción TIGIT-PVR (Figura 6). Estos datos estuvieron de acuerdo con la afinidad observada más alta de la interacción PVR-TIGIT (1-3 nM) en comparación con la interacción de PVR-CD226 (aproximadamente 115 nM, según Tahara-Hanaoka, S. et al. Int Immunol 16, 533-8 (2004)). Los estudios de competencia directa con CD96 no fueron posibles debido a la baja expresión de esa proteína, aunque TIGIT inhibió completamente la unión de PVR a las células CHO que expresan CD96. Los estudios de competencia anteriores demostraron que TIGIT, CD226 y CD96 comparten un sitio de unión común o sitios de unión que se superponen en el PVR. Este hallazgo se apoyó además mediante la observación de que el anticuerpo anti-PVR D171, que se une al dominio de IgV del extremo N de PVR, bloquea la unión de TIGIT y CD226 a PVR (Figura 7).

Ejemplo 3: Expresión de TIGIT y PVR(A) Expresión de TIGIT y de PVR en células inmunitarias en reposo y activadas

- 5 Se evaluó la distribución y expresión relativa de TIGIT y PVR en células inmunitarias como un indicador de la función de estas dos moléculas en la función inmunitaria normal, y se comparó con la expresión de CD226, una molécula conocida previamente y mostrada en el Ejemplo 2 por interaccionar con el PVR *in vivo*. Un estudio inicial había mostrado que la expresión de TIGIT era específica para células T y NK, a través, de múltiples tipos de células inmunitarias, así como una matriz de tejidos (Abbas, A.R. et al., Genes Immun 6, 319-31 (2005)). Se realizó un análisis adicional de la expresión de TIGIT en varias células inmunitarias y tejidos *ex vivo* y después de la activación. Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, TIGIT se expresa más fuertemente en células T reguladoras (T_{reg}), y también se expresa altamente en las células NK y células T_{th} del tejido amigdalino humano. TIGIT se expresó a un menor grado en células NK no estimuladas, en células T de memoria activadas y en reposo, en células T CD8⁺ y en células Th2 y Th1. Estos datos se correlacionan con los datos mostrados en la publicación de patente de EE.UU. N.º US20040121370, donde se mostró que TIGIT se expresaba significativamente en exceso en células T CD4⁺ aisladas activadas por anti-CD3/ICAM-1 y anti-CD3/anti-CD28 en comparación con células T CD4⁺ en reposo aisladas. Por el contrario, se ha informado que PVR se expresa en células endoteliales, fibroblastos, osteoclastos, células dendríticas foliculares, células dendríticas y células tumorales (Sakisaka, T. & Takai, Y., Curr Opin Cell Biol 16, 513-21 (2004); Fuchs, A. & Colonna, M., Semin Cancer Biol 16, 359-66 (2006)). Estos datos resaltan que TIGIT está asociada con células T que producen las citocinas reguladoras que pueden suprimir la respuesta inmunitaria.

- También se realizaron análisis de citometría de flujo complementarios, usando los mismos métodos que se describen en el Ejemplo 2. Se examinaron células T *ex vivo* humanas después de la activación para la expresión de TIGIT superficial usando un anticuerpo anti-TIGIT de hámster (10A7) que reacciona de manera cruzada con TIGIT humana y bloquea la interacción de TIGIT con PVR (véase la Figura 9). Los anticuerpos anti-TIGIT se generaron mediante inmunización de hámsteres con la proteína de fusión TIGIT-Fc murina y obteniendo anticuerpos anti-ratón de hámster de las mismas, usando técnicas convencionales. Dos anticuerpos, 10A7 y 1F4, también se unieron específicamente a TIGIT humana (datos no mostrados), y se usaron para experimentos adicionales. En particular, 10A7 y 1F4 se unen a diferentes epítopes en TIGIT humana, como se evidencia por el hecho de que la unión de 1F4 a TIGIT no bloquea la unión de 10A7 a TIGIT en la superficie de TIGIT que expresa células 293 (datos no mostrados). Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 10A7 se determinaron usando técnicas convencionales. La secuencia de la cadena ligera de este anticuerpo es: DIVMTQSPSSLAIVSPGKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGD GTKLEIKR (SEQ ID NO: 21) y la secuencia de la cadena pesada de este anticuerpo es: EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSTMHVVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRADNKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQ GTLTVTSS (SEQ ID NO: 22), donde las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada cadena se representan en texto en negrita. Así, CDR1 de la cadena ligera de 10A7 tiene la secuencia KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO: 23), CDR2 de la cadena ligera de 10A7 tiene la secuencia ASIRFT (SEQ ID NO: 24) y CDR3 de la cadena ligera de 10A7 tiene la secuencia QQGINNPLT (SEQ ID NO: 25). CDR1 de la cadena pesada de 10A7 tiene la secuencia GFTFSSTMH (SEQ ID NO: 26), CDR2 de la cadena pesada de 10A7 tiene la secuencia FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO: 27) y CDR3 de la cadena pesada de 10A7 tiene la secuencia RPLGHNTFDS (SEQ ID NO: 28).

- Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 1F4 se determinaron usando RACE 5' (véase, por ejemplo, Ozawa et al., BioTechniques 40(4): 469-478 (2006)). La secuencia de la cadena ligera de este anticuerpo es: DVVLTQTPLSLVSVFGDQVVISCRSSQSLVNSYGNFTLSWILHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 29) y la secuencia de la cadena pesada de este anticuerpo es: EVQLQQSGPELVKPGTSMKISKASGYSTGHLMNWKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 30), donde las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada cadena se representan por texto en negrita. Así, CDR1 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia RSSQSLVNSYGNFTLS (SEQ ID NO: 31), CDR2 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia GISNRF (SEQ ID NO: 32) y CDR3 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia LQGTHQPPT (SEQ ID NO: 33). CDR1 de la cadena pesada de 1F4 tiene la secuencia GYSFTGHLMN (SEQ ID NO: 34), CDR2 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 35) y CDR3 de la cadena pesada de 1F4 tiene la secuencia GLRGFYAMDY (SEQ ID NO: 36). Los cebadores usados para la metodología de secuenciación de RACE fueron los siguientes: cebadores específicos de gen de RT-PCR: (i) cadena pesada: IgGRace4: TTTYTTGTCCACCKTGCTGCTGC (SEQ ID NO: 37); IgGRace2: CTGGACAGGGATCCAGAGTTCC (SEQ ID NO: 38); IgGRace7: CARGTCAMDGTCACTGRCCTCAG (SEQ ID NO: 39); IgGRace1: GAARTARCCCTTGACCAGGC (SEQ ID NO: 64); (ii) cadena ligera: KapRace3: GTAGAAGTTGTTCAAGAAG (SEQ ID NO: 40); KapRace2: GAGGCACCTCCAGATGTTAAC (SEQ ID NO: 41); KapRace7: CTGCTCACTGGATGGTGGAAG (SEQ ID NO: 42); KapRace1: GAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO: 43); y cebadores de PCR de cola de 5' RACE: ODC2: GATTCAAATCTCAATTATATAATCCGAATATGTTTACCGGCTCGCTCATGGACCC CCCCCCCCCDN (SEQ ID NO: 65); ODC3: GAATTC CCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO: 45); ODC4: CTCATGGAC CCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO: 44).

46); ODC5: AAATATAATACCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO: 47); ADC5: AAATATAATACCCCCC (SEQ ID NO: 48), y ADC5X: CTCATGGACCCCCC (SEQ ID NO: 49).

Se determinó que la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de 1F4 era

5 GATGTTGTGTTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGTCTGTCAGCTTTGGAGATCAAGT
 TTCTATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGTAACAGTTATGGGAACACCTTTT
 TGTCTTGGTACCTGCACAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTTTGGGATT
 TCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCAGGGACA
 GATTTCACTCAAGATCAGCACAATAAAGCCTGAGGACTTGGGAATGTATTACT
 10 GCTTACAAGGTACGCATCAGCCTCCACGTTCTGGTCTGGGACCAAGCTGGAGGT GAAA (SEQ ID NO: 50) y se
 determinó que la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de 1F4 era

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAACCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCCATCTTATGAAGTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTATTCCTTACAA
 TGGTGGTACAAGCTATAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGA
 CAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGACTTCTGATGACTCT
 GCAGTCTATTTCTGTTCAAGAGGCCTTAGGGGCTTCTATGCTATGGACTACTGGG
 GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 51).

- 15 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana de las capas leucocíticas mediante centrifugación sobre Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). Se purificaron los subconjuntos de células indicados con kits de MACS correspondientes (Miltenyi). Se verificó la pureza de las células clasificadas mediante citometría de flujo y osciló de más del 93 % para las células purificadas mediante clasificación celular magnética a más de 98 % para las células purificadas mediante citometría de flujo. Todas las células se bloquearon con 10-20 %
- 20 de los sueros apropiados o IgG purificada antes de la tinción. Se realizaron análisis de PCR cuantitativa para evaluar los niveles de ARNm de proteínas de interés en las poblaciones de células clasificadas. El ARN total de las células clasificadas se aisló con el kit RNeasy (Qiagen) y se digirieron con DNase I (Qiagen). El ARN celular total se transcribió de manera inversa y se analizó mediante PCR con TaqMan™ en tiempo real por triplicado, según las instrucciones del fabricante, usando un sistema de detección de secuencias 7500 (Applied Biosystems). Las
- 25 unidades de expresión arbitrarias se proporcionan como las veces de la expresión con respecto a las células no estimuladas. Los cebadores directos e inversos usados para detectar TIGIT fueron: TGCCAGGTTCCAGATTCCA (SEQ ID NO: 52) y ACGATGACTGCTGTGCAGATG (SEQ ID NO: 53), respectivamente, y la secuencia de la sonda de TIGIT usada fue AGCCATGGCCGCGACGCT (SEQ ID NO: 54).
- 30 Se aislaron células T CD4⁺ de CMSP y se activaron con anti-CD3 y anti-CD8. La TIGIT expresada en la superficie celular fue indetectable en células CD4⁺CD45RA⁺ intactas no estimuladas, mientras que las células CD4⁺CD45RO⁺ no estimuladas tuvieron una expresión baja pero detectable (Figuras 10A-1 a 10A-2). Como se muestra en las Figuras 10A-1 a 10A-2, la expresión de TIGIT difirió significativamente de la expresión de CD226 en los subconjuntos de RA⁺ frente a RO⁺ de las células T CD4. Los análisis del ARNm en las poblaciones de células
- 35 inmunitarias clasificadas directamente ex vivo de las CMSP mostraron una mayor expresión de TIGIT en células T_{reg}, RO y NK que en otros tipos de células estudiados con respecto a la expresión de TIGIT en células CD4⁺CD45RA⁺ intactas (Figura 10B). Después de la activación con anti-CD3 y CD28, la TIGIT expresada en la superficie de la célula se reguló por incremento en tanto poblaciones de células T intactas como de memoria, como se muestra en las Figuras 10A-1 a 10A-2. Las células de memoria CD4⁺CD45RO⁺ tuvieron niveles significativamente más altos de
- 40 expresión 24 y 48 horas después de la activación en comparación con las células CD4⁺CD45RA⁺ intactas (Figuras 10A-1 a 10A-2). Las células de memoria CD4⁺CD45RO⁺ expresaron 5,3 veces más ARNm de TIGIT en el día 1 que en el día 0, mientras que las células intactas solo aumentaron la expresión de TIGIT 1,4 veces con respecto al día 0 (Figura 10C). La expresión de TIGIT no fue detectable en el día 6.
- 45 También se evaluó la estabilidad de la expresión de TIGIT en células T. Brevemente, se aislaron células CD4⁺CD45RO⁺ y se activaron con anti-CD3/anti-CD28 durante un día. Las células se clasificaron con flujo mediante FACS para las poblaciones de CD4⁺ y CD4⁺TIGIT⁺. Después de reposar durante cinco días después de la clasificación, las células se re-estimularon con anti-CD3/anti-CD28 durante hasta tres días y la expresión de TIGIT en la superficie celular se determinó mediante FACS. En un experimento separado, las células TIGIT⁺ y las células
- 50 CD4⁺ se sembraron en placa a una densidad de 2 x 10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertos con varias concentraciones de anti-(0-0,8 µg/ml), un volumen de 100 µl y se cultivaron durante 4 días bajo condiciones estándar. Se añadió ³H-timidina durante las 18 horas finales de la incubación, seguido por lavado. Al final de los cuatro días, las células se solubilizaron y la radiactividad asociada con cada muestra se midió mediante recuento por centelleo. Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, la expresión de TIGIT se indujo en tanto células TIGIT⁺ como
- 55 células TIGIT⁻, que indica que las células TIGIT⁺ pueden expresar TIGIT bajo ciertas circunstancias y que las células

TIGIT⁺ no son una población celular fija.

Dado el nivel de expresión más alto de TIGIT en células de memoria efectoras, se analizó minuciosamente adicionalmente la expresión en subconjuntos de células T. Dado que las moléculas coestimuladoras o coinhibidoras expresadas en células T efectoras/de memoria activadas se expresan frecuentemente en T_{reg} inducidas, se evaluó la expresión de TIGIT en células T_{reg}. Las células T_{reg} están definidas fenotípicamente como células CD25^{hi}, y son conocidas por expresar el factor de transcripción FoxP3 (Fontenot, J.D. et al., *Immunity* 22, 329-41 (2005)). En ratones, el factor de transcripción FoxP3 se usa para definir poblaciones de células T_{reg} (Linsley, P.S. et al., *Science* 257, 792-5 (1992)). Sin embargo, esta asociación no se mantiene en células T humanas, ya que todas las células T humanas activadas expresan FoxP3 (Ziegler SF., *Eur J Immunol.* 37(1):21-3 (2007)). Células CD4⁺CD25^{hi} aisladas recientemente *ex vivo* expresaron TIGIT, mientras que las células CD25⁻ fueron negativas para la expresión en la superficie celular de TIGIT (Figura R(D)). Las células T TIGIT⁺ también coexpresaron FoxP3 y GITR (Figuras 9 y 10E). La activación de células CD25⁺ clasificadas produjo una regulación por incremento de la expresión de proteínas TIGIT (Figura 10F) y un aumento de 6,5 veces en los niveles del ARNm (Figuras 10C y 10F). Las veces de aumento en el ARNm de TIGIT fueron equivalentes en las células T_{reg} y T de memoria.

La comparación de los niveles de ARNm de las células inmunitarias clasificadas directamente *ex vivo* de las CMSP del donante mostró que las células T_{reg} CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD45RO⁺ y NK tuvieron cada una una expresión significativa de TIGIT, presentando las células T_{reg} la expresión más alta (Figura 10C). La expresión de TIGIT no se observó en células B o monocitos en reposo o activados (Figura 10C y datos no mostrados). En particular, CD226, otro correceptor para PVR, no se reguló por incremento en células T_{reg} CD4⁺CD25^{hi}, sugiriendo funciones reguladoras divergentes de TIGIT frente a CD226 (Figura 11).

En otros experimentos, se examinó la expresión de TIGIT en células T (T_{FH}) amigdalinas humanas usando citometría de flujo, siguiendo protocolos convencionales como se han descrito anteriormente, con la excepción de que para los ensayos que involucran a FoxP3, las células se tiñeron con anticuerpos siguiendo el protocolo anterior, seguido por fijación y permeabilización de las células y tinción con anti-FoxP3 o IgG de control. La expresión de TIGIT se correlacionó con altos niveles de co-expresión de CXCR5 e ICOS en células T, marcadores que se observan normalmente en células T_{FH} (Figura 8A). Por el contrario, la expresión de CD226 (DNAM) en aquellas células fue de baja a inexistente (Figura 8A). También se observaron altos niveles de expresión de TIGIT en células Th que producen IL-17 CD4⁺CCR4⁺CCR6⁺ (Figura 14). En general, se mostró que TIGIT se expresaba por células T reguladoras en reposo y activadas, células T_{fh} amigdalinas humanas, células T auxiliares que producen IL-17, células T auxiliares efectoras/ de memoria en reposo y activadas (células CD4⁺CD45RO⁺) y células NK, y pueden además regularse por incremento, tras la activación de estas células. Las células CD8⁺ también expresan TIGIT y esta expresión solo es regulada por incremento ligeramente tras la activación celular. CD226 se muestra en el presente documento y es conocido en la técnica por ser expresado por células T CD8⁺, en células T CD45RA⁺, mastocitos, plaquetas, células citotóxicas naturales (NK), células T CD4⁺CD45RA⁺ activadas y células T CD4⁺CD45RO⁺. TIGIT se expresa específicamente en T_{reg} y T_{FH} y células CD4⁺CD45RO⁺ efectoras/de memoria en reposo; mientras que CD226 no se expresa en estas células.

(B) Expresión de TIGIT y PVR en enfermedad humana

Habiendo determinado que TIGIT se expresa altamente en poblaciones seleccionadas de células inmunitarias, a continuación se evaluaron los niveles de expresión de TIGIT, PVR y CD226 en tejidos de diferentes estados de enfermedad relacionada con la inmunidad, que incluyen psoriasis, trastorno inflamatorio del intestino, artritis, asma y cáncer. Se utilizó un sistema basado en micromatriz para los estudios, y la descripción del protocolo de micromatrices apropiado puede encontrarse en la bibliografía, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. N.º US20080038264. Como se muestra en la Figura 15, se observó una expresión significativa de TIGIT en tejido sinovial humano inflamado con respecto al tejido no inflamado, particularmente notable en el caso de tejido de artritis reumatoide. Dentro de las muestras de tejido de artritis inflamado, la expresión de TIGIT se correlacionó principalmente con células T, a diferencia de macrófagos o fibroblastos (véase la Figura 15, panel derecho). Estos datos se confirmaron además en modelos de artritis murina inducida por colágeno (CIA) mediante análisis por RT-PCR de niveles de ARNm de TIGIT (véase la Figura 16). En el modelo de CIA usado en el presente documento, se inmunizaron ratones DBA-1J con 100 µg de colágeno bovino del tipo II en 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) en el día 0 y día 21 intradérmicamente. El ARN se extrajo de las articulaciones de las patas traseras en los días 28, 30 y 40 se evaluó para la expresión de TIGIT y CD226, como se describió anteriormente. Como se observa en la Figura 16, se observó un aumento de la expresión de TIGIT en el día 40, mientras que la expresión de CD226 estuvo significativamente desregulada en el día 40.

Se observaron aumentos menores en la expresión de TIGIT con respecto a los tejidos normales en muestras de tejido con psoriasis y muestras de tejido con enfermedad inflamatoria del intestino. Análisis similares en muestras de tejido con asma de monos rhesus mostraron que la expresión de TIGIT está significativamente elevada en el tejido con enfermedad en comparación con el tejido de control normal (Figura 17). Las muestras de cáncer de mama también presentaron una expresión de TIGIT enormemente aumentada, con relación al tejido de mama normal, con cantidades variables en diferentes tipos de tejido de cáncer de mama. Como se muestra en el panel superior de la Figura 18B, la expresión más grande de TIGIT se observó en muestras de tumor con el porcentaje más bajo de

células tumorales, sugiriendo que la expresión de TIGIT se correlaciona con otras células que infiltran el tumor en vez de con las mismas células tumorales. El panel inferior de la Figura 18A indica que las células CD4⁺ están aumentadas en muestras de tumor que tienen bajos porcentajes de células del tumor. Dado que los datos presentados en el presente documento con respecto a la expresión de TIGIT en T_{reg} y otros subconjuntos de células T, los altos niveles de expresión de TIGIT observados en las muestras de tumor de mama con los porcentajes más bajos de células tumorales sugieren que TIGIT está siendo expresado por infiltrados de tumor de células inmunitarias, lo más probablemente infiltrados de T_{reg}. La correlación de la expresión de TIGIT con las células T en las muestras de cáncer de mama sugiere que TIGIT puede desempeñar una función en la regulación del tumor. Por ejemplo, un tumor puede evadir la respuesta inmunitaria del hospedador reclutando/activando células T_{reg} TIGIT⁺.

Ejemplo 4: Función de TIGIT en la activación de células T

Dados los altos niveles de expresión de TIGIT por T_{reg} y las células T de memoria mostradas anteriormente, y la expresión conocida de PVR en células dendríticas (Pende, D. et al., Blood 107, 2030-6 (2006)), se investigó la posibilidad de que la TIGIT pudiera modificar la función de DC y efectuar la activación de células T.

(A) Función de TIGIT en la modulación de la proliferación de células T

Se evaluó el efecto de TIGIT-Fc en un ensayo de proliferación de la reacción de linfocitos mixtos (MLR) usando DC humanas derivadas de monocitos maduras con TNF α . Brevemente, los monocitos se aislaron mediante selección negativa de CMSP totales humanas (Miltenyi Biotec). Se generaron DC derivadas de monocitos inmaduras (iMDDC) incubando monocitos (3×10^5 células/ml) en medio RPMI 1640 completo que contenía 10 % de FBS, penicilina y estreptomycin, complementado con IL-4 humana recombinante (125 ng/ml, R&D Biosystems) y GM-CSF humana recombinante (50 ng/ml, R&D Biosystems) en una atmósfera humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 5 días. Se añadieron nuevamente GM-CSF e IL-4 en el día 2 y día 4 con medio RPMI 1640 completo fresco. Después de cinco días de cultivo, más del 90 % de las células presentan un fenotipo DC inmaduro (CD14⁻, clase II⁺ de MHC, CD80⁺, CD86⁺ y CD83^{low}), como se verificó mediante análisis FACS. Estas DC inmaduras se usaron aquí para el tratamiento con LPS, CD40L, TNF α , Pam3CSK4 y TSLP, y las proteínas de fusión indicadas para inducir su maduración. Se llevaron a cabo análisis fenotípicos de las MDDC y las líneas celulares mediante inmunofluorescencia. Los anticuerpos monoclonales usados para la tinción de la superficie celular incluyeron anti-CD83, FITC-HLA-DR, PE-anti-CD86 y FITC-anti-CD80 marcados con PE. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de 10 % de suero AB humano para prevenir la unión a través de la porción Fc de las fusiones/anticuerpos. Se realizaron estudios del inhibidor mediante preincubación de las moléculas indicadas con 10 μ M de un inhibidor MEK1 (PD98059), 1 μ g/ml del anticuerpo anti-IL-10, 10 μ g/ml del anticuerpo anti-CD32 o 10 μ g/ml del anticuerpo anti-TIGIT, antes de la estimulación con TNF α (0,1 μ g/ml). Se usaron disolvente DMSO o la IgG humana como control. Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron después de 16 horas y se ensayaron para la producción de IL-12 p40 mediante ELISA.

Se evaluó el efecto del anticuerpo bloqueante anti-TIGIT 10A7 sobre la proliferación y activación de las células T. No se observó un efecto tras la incubación de células T CD4⁺ CD45RO⁺ activadas con anti-CD3 con 10A7. Cuando las células T se cultivaron con anti-CD3, junto con DC CD11c⁺ autólogas, la proliferación de las células T aumentó dos veces ($p < 0,01$) y la producción de IFN γ aumentó cuatro veces ($p < 0,001$) (Figura 19C). Esta exacerbación de la actividad de las células T se observó a un grado menor en CMSP totales. A diferencia, TIGIT-Fc inhibió significativamente la activación de células T ($p < 0,01$) y la producción de IFN γ ($p < 0,001$) en presencia de DC CD11c⁺ (Figura 19D). Cuando las CMSP totales se activaron con anti-CD3, TIGIT-Fc tuvo un efecto más suave que el observado en el experimento previo, sugiriendo que la cantidad de PVR presente en las células puede ser importante para la actividad. No se observó efecto en células T solas, como se esperaba, dado que TIGIT no se une a tales células. Se encontró también que el tratamiento con anticuerpo anti-TIGIT bloquea la supresión de T_{reg} de la proliferación de células T solo en presencia de APC. Se encontró además que TIGIT-Fc regula la función de células CD11c⁺ e inhibe la proliferación de las células T intactas en ensayos Transwell, que indica que las modificaciones observadas en el comportamiento y la proliferación celular se deben específicamente a la unión a TIGIT. Tomados juntos, estos datos sugirieron que TIGIT regulaba la activación de células T vía la interacción con un ligando en APC, lo más probablemente PVR.

Tanto las iMDDC como las MDDC maduras por el TNF α expresan el PVR superficial, con las MDDC que expresan niveles más altos de PVR que las iMDDC (Figura 19A). Las MDDC maduras con TNF α también incrementaron la proliferación de las células T con respecto a las iMDDC no estimuladas (Figura 19B). En los ensayos con MLR, la adición de TIGIT-Fc resultó en una disminución modesta pero significativa en la proliferación, mientras que TIGIT-Fc agregado a las MDDC maduras por el TNF α redujeron la proliferación a niveles de la línea basas. La inhibición de proliferación inducida por la TIGIT se evitó tras la inclusión adicional del anticuerpo anti-TIGIT 10A7 o el anticuerpo anti-PVR TX21. Los niveles de IL-10 secretada en el día 3 fueron significativamente más altos en los cultivos que contienen TIGIT-Fc que aquellos que contienen el control del isotipo (45 ± 5 pg/ml frente a 29 ± 8 pg/ml, respectivamente, con una $p = 0,04$). La inclusión del anticuerpo anti-TIGIT o el anticuerpo anti-PVR también bloqueó el incremento inducido por TIGIT-Fc en la IL-10 secretada (datos no mostrados). Los niveles de IFN γ se redujeron mediante el tratamiento con TIGIT-Fc (datos no mostrados). Tomados juntos, estos datos sugieren que la TIGIT modula la activación de las células T.

Para examinar el efecto de células T TIGIT⁺ sobre la proliferación de células T TIGIT⁻ en cocultivo, se realizaron ensayos de MLR adicionales. Brevemente, se aislaron células T CD4⁺CD45RO⁺ de CMSP humanas y se activaron durante cinco días. En el día seis, las células se reestimularon con anti-CD3/anti-CD28 durante la noche y las células TIGIT⁺ se clasificaron de manera separada de las células TIGIT⁻ mediante FACS. Las células TIGIT⁺ se marcaron con CFSE y se mezclaron a una relación de 10:1 con las células CD11c⁺ aisladas de un segundo donante, con o sin el mismo número de células TIGIT⁺ en cultivo. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron en el día siete para el análisis luminex de la producción de citocinas (IFN γ o IL-17). La proliferación celular se analizó mediante FACS, activando las células CFSE⁺ vivas, en el día ocho. Los resultados se muestran en las Figuras 20A y 20B. Como se muestra en la Figura 20A, las células T TIGIT⁺ expresaron niveles más bajos de IFN γ e IL-17 que las células T TIGIT⁻. Cuando las células T TIGIT⁺ se mezclaron con las células T TIGIT⁻, el cultivo resultante fue significativamente menor en la producción de estas dos citocinas, que indica que las células T TIGIT⁺ inhiben la producción de células T TIGIT⁻ de estas dos citocinas. Las células TIGIT⁺ también inhibieron la proliferación de las células T TIGIT⁻ (Figura 20B). Esto apoya además la idea de que las células TIGIT⁺ son en realidad células reguladoras y pueden actuar en células CD4⁺ para inhibir su respuesta, ya sea directamente a través de la secreción de citocinas inhibitorias o indirectamente vía el acoplamiento de PVR en las células presentadoras de antígenos.

Basándose en la observación en el Ejemplo 3(A) de que las células T_{reg} CD4⁺CD25^{hi} en particular expresan altamente TIGIT, se realizaron ensayos para examinar la capacidad del subconjunto de células T T_{reg} para inhibir la proliferación de otras células inmunitarias. Brevemente, se aislaron células T_{reg} CD4⁺CD25^{hi} de la capa leucocítica con un kit MACS kit (Miltenyi), siguiendo las instrucciones del fabricante. También se prepararon células CD4⁺CD25⁻ como las células T efectoras que van a usarse en el ensayo. Se aislaron poblaciones de células presentadoras de antígenos (APC) mediante métodos convencionales, irradiando CMSP que se habían gastado previamente en células T, usando microperlas de CD3 MACS (Miltenyi). Se mezclaron células T_{reg}, células T efectoras y las APC aisladas a una relación de 1:4:4 y se incubaron con 0,5 μ g/ml de anti-CD3 soluble. Las células mezcladas se sembraron en pocillos recubiertos con 10 μ g/ml del anticuerpo anti-TIGIT 10A7 o una IgG de control y se cultivaron durante cuatro días con [³H]-timidina añadida durante las 18 horas finales de la incubación. Se solubilizaron las células de cada pocillo y se cuantificó la cantidad de radiactividad en cada muestra de células. Los valores indicados del porcentaje de proliferación se calcularon con respecto a la cantidad de radiactividad observada en las células efectoras en ausencia de células T_{reg}. Los resultados se muestran en la Figura 21A. En los pocillos recubiertos con IgG de control, se observó aproximadamente el 55 % de proliferación celular, manteniéndose con el hallazgo experimental que las células T TIGIT⁺ inhibieron la proliferación de células T TIGIT⁻. La inclusión de un anticuerpo anti-TIGIT en los pocillos aumentó significativamente la proliferación observada, confirmando que la TIGIT media el efecto supresor. Esta evidencia sugiere además que T_{reg} TIGIT⁺ pueden actuar como reguladores negativos de la proliferación y función de las células inmunitarias. En realidad, cuando T_{reg} CD4⁺CD25^{hi}TIGIT⁺ y T_{reg} CD4⁺CD25^{hi}TIGIT⁻ se aislaron y examinaron de manera separada para su capacidad para suprimir la proliferación de células T intactas, se encontró que T_{reg} TIGIT⁺ eran más potentes en suprimir la proliferación de células T intactas que T_{reg} TIGIT⁻. Brevemente, se aislaron T_{reg} TIGIT⁺ y TIGIT⁻ mediante FACS. Se seleccionaron de manera positiva células CD11c⁺ usando CD11c-PE (BD Biosciences) y microperlas anti-PE (MACS). Se sembraron células T intactas en una placa de 96 pocillos con fondo de U a una densidad de 4 x 10⁵, junto con 2 x 10⁵ células T_{reg} y 0,8 x 10⁵ células presentadoras de antígenos CD11c⁺. Como se muestra en la Figura 21B, las células T_{reg} TIGIT⁺ fueron casi el doble de potentes en suprimir la proliferación de células T intactas que las células T_{reg} TIGIT⁻, apoyando además el hallazgo de que T_{reg} TIGIT⁺ pueden actuar como reguladores negativos de la proliferación y función de células inmunitarias.

(B) Inactivación TIGIT

Usando la línea celular estable que expresa TIGIT marcada con gD (células 293-TIGIT) construida anteriormente, se encontró que estas células no presentaban fosforilación de TIGIT tras la interacción con PVR exógeno, anticuerpo monoclonal anti-TIGIT 10A7 reticulado o con el tratamiento con pervanadato. Además, el tratamiento con 10A7 de estas células no produjo efecto significativo en la señalización de TCR. Estos datos sugirieron que cualquiera de los motivos ITIM en la TIGIT expresada en las células construidas no fueron funcionales o que la línea celular estable carecía de uno o más componentes necesarios para la activación de TIGIT.

Para dilucidar además las funciones intrínsecas de las células para TIGIT, se realizaron estudios de ARN inhibidor (ARNi). Se obtuvieron ARNi específicos de genes On-Targetplus y ARNi de control negativos de tecnología de ARNi de Dharmacon. Se purificaron células T CD45RO⁺ humanas de la capa leucocítica con un kit MACS[™] (Miltenyi Biotec) y se marcaron con CFSE. Se transfectaron células T ARNi_{control} o ARNi_{TIGIT} en estas células con la tecnología Nucleofector[™] (Amaxxa) según las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas, las células transfectadas se activaron con anti-CD3 unido a la placa (5 μ g/ml), solo o más 2 μ g/ml de anti-CD28 soluble. Se recogieron algunas células en el día 2 o día 5 después de la activación para los análisis de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) o FACS. La proliferación de células T se determinó mediante FACS en el día 5, como se describió anteriormente. Se realizó qRT-PCR como se describió anteriormente en el Ejemplo 3(A), y se usaron los niveles de ARNm de RPL-19 en cada muestra como los controles internos. Los cebadores de TIGIT se proporcionan anteriormente; los cebadores de CTLA4 y CD226 humanos y los problemas se obtuvieron de Applied Biosystems. Las secuencias de cebadores y sondas usadas para detectar diferentes especies de IL-12 e IL-10 murinas fueron las

siguientes: mL-12p40: cebador directo: 5'-ACATCTACCGAAGTCCAATGCA-3' (SEQ ID NO: 55); cebador inverso: 5'-GGAATTGTAATAGCGATCCTGAGC-3' (SEQ ID NO: 56); sonda: 5'-TGCACGCAGACATTCCCGCCT-3' (SEQ ID NO: 57); mL-12p35: cebador directo: 5'-TCTGAATCATAATGGCGAGACT-3' (SEQ ID NO: 58); cebador inverso: 5'-TCACTCTGTAAGGGTCTGCTTCT-3' (SEQ ID NO: 59); sonda: 5'-TGCGCCAGAAACCTCTGTGG-3' (SEQ ID NO: 60); mL-10: cebador directo: 5'-TGAGTTCAGAGCTCCTAAGAGAGT-3' (SEQ ID NO: 61); cebador inverso: 5'-AAAGGATCTCCCTGGTTTCTC-3' (SEQ ID NO: 62); sonda: 5'-TCCCAAGACCCATGAGTTTCTTCACA-3' (SEQ ID NO: 63).

Se empleó ARNi específico para TIGIT para inactivar específicamente la expresión de TIGIT en células T CD45RO⁺ humanas primarias, que normalmente expresan altos niveles de TIGIT (Figuras 10A-1 a 10A-2). La eficacia de la inactivación de TIGIT usando este método se evaluó mediante análisis de qRT-PCR y FACS (Figuras 28A, 28B y Tabla 7). En el segundo día del tratamiento, la transcripción de TIGIT se redujo >90 % mediante el tratamiento con ARNip_{TIGIT} en comparación con un ARNip_{control} mezclado, mientras que el ARNm de CTLA4 (una proteína de control) no cambió por el tratamiento. La reducción en el ARNm de TIGIT produjo una disminución de TIGIT de la superficie celular de un promedio del 25 % a <2 % de las células T (Figura 28B). En el día 5, la expresión de TIGIT en esas mismas células se redujo el 70 % en comparación con la expresión en células de control (Figuras 28A y 28B, y Tabla 7). La inactivación de TIGIT no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación de células T, en respuesta a anti-CD3 (ya sea a concentraciones subóptimas u óptimas) o a anti-CD3 más anti-CD28 (Figura 28C). Similarmente, la inactivación de TIGIT tampoco tuvo un efecto observado sobre la producción de citocinas IL-2, IL-4, IL-10 o IFN- γ (Figura 28E). Además, el tratamiento de las células con el anticuerpo anti-TIGIT 10A7 tampoco tuvo un efecto observado sobre la activación de células T que expresan TIGIT bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente (Figura 28D).

Tabla 7. Eficiencia de la inactivación del ARNi de TIGIT

C _T	ARNip _{control}		ARNip _{TIGIT}	
	Día 2	Día 5	Día 2	Día 5
ARNm de TIGIT	23,3 ±0,1	24,0 ±0,0	31,2 ±0,6	29,8 ±0,1
ARNm de CTLA4	27,2 ±0,4	24,3 ±0,3	27,6 ±0,3	23,8 ±0,3

*Los valores de C_T se proporcionan como el valor de C_T ± desviación estándar para TIGIT o CTLA4

Ejemplo 5: Efecto de TIGIT sobre la producción de la citocinas

Para determinar si TIGIT tuvo un efecto directo sobre las DC diferente al efecto general descrito anteriormente sobre la maduración de células T, se evaluó la maduración y la función de DC en ausencia y presencia de TIGIT-Fc. El resultado en el Ejemplo 4 con respecto a la capacidad de TIGIT para modular la producción de IFN γ e IL-17 en las poblaciones mezcladas de células T sugirió que deben realizarse estudios adicionales de la producción de citocinas por las DC tratadas con TIGIT-Fc. Se purificaron células T no tratadas mediante selección negativa (kit de aislamiento de células T CD4, Miltenyi Biotech) a una pureza del >95 %. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo con suplementos nutricionales convencionales. Se cultivaron células T alógenas (2 x 10⁵) en ausencia (medio solo) o presencia de iMDDC e MDDC a la relación indicada en las μ placas de 96 pocillos con fondo de U (Nunc) en 200 μ l de medio por pocillo. Las células se cultivaron durante 72 horas, seguido por un impulso de 18 horas con 1 μ Ci (0,037 MBq) de [³H]timidina (Amersham). Las células se transfirieron a una placa Unifilter-96 GF/C usando un recolector de células y se midió la incorporación de [³H]timidina en fluido de centelleo usando un contador de centelleo (Canberra Packard Ltd.). Todas las determinaciones de llevaron a cabo por triplicado. Se analizó la producción de citocinas por las iMDDC en los sobrenadantes recogidos en el día 5 de cultivo y almacenados a -80 °C. Las mismas MDDC se maduraron en presencia o ausencia de los estímulos indicados durante 24 horas en presencia o ausencia de TIGIT-Fc o TIGIT-Fc-DANA. Después de 48 horas de estimulación, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80 °C. Las concentraciones de citocina se midieron mediante ELISA (R&D Biosystems) según las instrucciones del fabricante, o usando perlas inmovilizadas con el anticuerpo LINCoplex (LINCO Research) con detección por un instrumento Luminex 100 (Luminex) según las instrucciones del fabricante.

Cuando se añadieron TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA o CD226-Fc a las iMDDC durante la maduración con TNF α o CD40L soluble, se redujeron significativamente la producción de IL-12/23p40 y la producción de IL-12p70 en comparación con el tratamiento con el control del mismo isotipo ($p=0,007$ y $p=0,03$, respectivamente), a niveles comparables para iMDDC (Figuras 22A-1 a 22A-3). En cambio, IL-10 secretada aumentó mediante el tratamiento con TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA o CD226-Fc, con respecto al tratamiento con control del mismo isotipo ($p=0,027$ y $p=0,18$, respectivamente) (Figuras 22A-1 a 22A-3). La secreción de TGF β también aumentó en iMDDC en respuesta al tratamiento con TIGIT-Fc (véase la Figura 22D). Sin embargo, la TIGIT-Fc no afectó la capacidad de las iMDDC a madurar a MDDC, ya que CD80, CD86, CD83 y HLA-DR estuvieron equivalentemente regulados por incremento en los cultivos de control de isotipo (Figura 22B). En particular, la interacción de TIGIT-PVR no indujo directamente la maduración de DC.

También se examinó el efecto de TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA y CD226-Fc en las vías de maduración de DC mediadas

por TLR. El tratamiento con cada una de las tres proteínas de Fc presentó un aumento similar, aunque menos robusto, de la producción de IL-10 de LPS (MDDC maduras con TLR4 ($p < 0,01$), una disminución en IL-12/23p40 ($p = 0,07$ a $0,18$) y una disminución significativa en la producción de IL-12p70 ($p < 0,05$ para todas las proteínas de fusión) (véanse las Figuras 22A-1 a 22A-3), y no tuvo efecto sobre la vía de maduración de TLR2. Esta modulación de la producción de IL-10 e IL-12p40 mediante el tratamiento con TIGIT de las DC fue similar a si se añadiera TIGIT-Fc a los monocitos durante la diferenciación con GM-CSF e IL-4, o cuando solo se añadió durante la fase de maduración (datos no mostrados). Los efectos de TIGIT-Fc sobre la producción de IL-10 e IL-12p40 en las iMDDC no sometidas a maduración fueron modestos, pero ya que los niveles observados de estas citocinas en las iMDDC fueron bajos, los efectos estadísticamente significativos pueden ser difíciles de detectar (Figura 22B). En particular, CD226 funcionó de manera similar a TIGIT en estos ensayos, apoyando una función del PVR en las MDDC. Dado que CD226 tiene un motivo ITAM y puede actuar potenciando las señales TCR (Dalhardon et al. J. Immunol. 175: 1558-1565 (2005)), el grado de expresión de TIGIT y/o CD226 en diferentes subconjuntos de células T puede contribuir a la regulación diferencial de las respuestas inflamatorias locales *in vivo* (Figura 10, Figura 29).

También se determinaron los niveles de producción de otras citocinas proinflamatorias mediante las DC tratadas con TIGIT-Fc. Se redujeron significativamente tanto la producción de IL-6 como de IL-18 mediante el tratamiento con TIGIT-Fc en todas las poblaciones de MDDC maduras. IL-12p40 es una subunidad conocida de tanto IL-12p70 como la IL-23, de manera que los niveles de producción de ambas de estas citocinas se midieron en los cultivos de MDDC tratados con TIGIT-Fc. En comparación con los cultivos de control, el tratamiento con TIGIT-Fc produjo una producción de IL-12p70 significativamente disminuida por las MDDC maduras con TNF α o CD40L (Figura 22C). Los niveles de IL-23 fueron relativamente bajos y apenas detectables en las condiciones del ensayo. TIGIT-Fc redujo tanto IL-6 como IL-18 en todas las condiciones de MDDC maduras, pero debido a la variabilidad del donante la reducción observada no fue estadísticamente significativa.

Para evaluar si el efecto observado de TIGIT-Fc requiere la reticulación de PVR, se usó una versión mutada con Fc de TIGIT-Fc en la que la unión de Fc γ R de anuló completamente (TIGIT-Fc-DANA, descrita en el Ejemplo 1). Como se muestra en las Figuras 22A-1 a 22A-3, ambas de TIGIT-Fc y TIGIT-Fc-DANA inhibieron igualmente y de manera significativa la IL-12p40 y potenciaron la producción de IL-10 de DC maduras con TNF α . Este resultado indicó que el sesgo de la citocina por la proteína de fusión de TIGIT no era dependiente de la reticulación mediada por Fc.

No se observó la capacidad de TIGIT para modificar el patrón de producción de citocinas de las DC en todas las condiciones de maduración *in vitro*. El efecto fue más pronunciado en las vías de maduración inducidas por TNF α , CD40L soluble y LPS (TLR4), mientras que la maduración mediada por TLR2 permaneció no afectada. Se ha mostrado que LPS y Pam3CSK4 activan a ERK y p38 a varios grados: LPS activa principalmente los resultados del tratamiento con p38 y Pam3CSK4 en la actividad de la cinasa ERK alta. Así, no es sorprendente que el tratamiento con TIGIT-Fc de las DC maduras con Pam3CSK4 muestre poco efecto (véanse las Figuras 22A-1 a 22A-3). La capacidad diferencial de éstos y otros estímulos, tales como TNF α y CD40L para regular las vías de ERK/p38, es significativa en determinar el resultado de la función de MDDC. No solo se ha demostrado que las DC expanden T_{reg}, sino que las DC también pueden romper la tolerancia de las T_{reg} e inducir la activación y producción de IL-2 (Fehervari, Z. & Sakaguchi, S., Curr Opin Immunol 16, 203-8 (2004)). La capacidad de la TIGIT para modificar las DC en algunas condiciones de maduración, pero no otras, sugiere que la modulación de la TIGIT es un método mediante el cual T_{reg} y las células T activadas pueden afinar la función de DC.

También se realizaron estudios de la función de TIGIT en un modelo de ratón que carecía de células B y T, pero que tenía macrófagos y células dendríticas (ratones scid). Brevemente, se trataron ratones CB17/SCID (6-8 semanas de edad) una vez por vía intravenosa con 200 μ g de TIGIT.Fc, TIGIT.DANA, o un anticuerpo anti-ambrosía de control. Se administró el anticuerpo monoclonal anti-CD40 o el control del isotipo (200 μ g/ratón) seis horas después. El suero se recolectó 16 horas después para analizar los niveles de IL-10, MCP-1, IL-12p40 y IL-12p70 mediante un ensayo ELISA. La administración de TIGIT-Fc o TIGIT-Fc-DANA en los ratones scid estimuló la producción de IL-10 e IL-12p40 y disminuyó la producción de IL-12p70 (Figuras 13A-C). Este hallazgo fue según los datos *in vitro* anteriores, y sugiere que TIGIT no requiere células B o T para ejercer sus efectos moduladores de citocinas.

De los ejemplos precedentes, la expresión de TIGIT se restringió a las células T y células NK, con la expresión más alta encontrada en T_{reg}. CD226, el ligando de baja afinidad para el PVR, no se expresa en células T_{reg} a pesar de la expresión en células T activadas (Abbas, A.R. et al., Genes Immun 6, 319-31 (2005); Dardalhon, V. et al., J Immunol 175, 1558-65 (2005)). Aunque queda por determinar el equilibrio de TIGIT y CD226 *in vivo*, la afinidad más alta de TIGIT por el PVR sugiere que desempeña una función dominante cuando ambos se coexpresan. Tomados conjuntamente, la alta expresión de TIGIT en células T y células T_{reg} activadas, y la interacción de TIGIT con PVR para inducir IL-10 y para inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias de las DC maduras, sugiere que TIGIT proporciona un mecanismo de retroalimentación para regular por disminución la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 6: Efecto de TIGIT sobre la señalización de PVR

Ya que la vía de señalización de MAPK es importante EN regular la vía de IL-10 (Xia, C.Q. & Kao, K.J., Scand J Immunol 58, 23-32 (2003)), se evaluó la actividad de varios miembros de la vía MAPK en MDDC tratadas con TIGIT.

5 Se privaron de suero CHO-PVR durante tres horas, a continuación se trataron con 50 µg/ml de TIGIT-Fc o no se trataron durante 15 minutos a 37 °C. Las células se homogeneizaron y las proteínas de la membrana se extrajeron utilizando un kit de extracción de membrana plasmática (BioVision) y se sometieron a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras, seguido por la transferencia a membranas de nitrocelulosa (BioRad). Las membranas se bloquearon con 5 % de BSA en Tris-HCl 50 mM (pH 7,6),
 10 NaCl 150 mM, 0,1 % de Tween-20 y a continuación se sondaron con anti-fosfotirosina-HRP (BD Bioscience), se depuraron con tampón Restore (Pierce), y se volvieron a sondear con anticuerpo policlonal de cabra anti-PVR (R&D Systems). En el día 5, las iMDDC se trataron con 10 µg/ml de TIGIT-Fc o con IgG humana de control durante el periodo de tiempo indicado a 37 °C. Se prepararon lisados celulares totales en tampón RIPA y se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) Immobilon
 15 (PVDF, Millipore). Después del bloqueo con 1 % de BSA en Tris-HCl 50 mM a pH 7,6, NaCl 150 mM, 0,1 % de Tween-20, seguido por detección mediante proteína quimioluminiscente. Para volver a sondear, las membranas se incubaron en tampón de depuración (Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,7, β-mercaptoetanol 100 mM, 2 % de SDS) durante 30 minutos a 50 °C con agitación ocasional. La detección de fosfotirosina, fosfo-p38MAPK y fosfo-ERK se llevó a cabo usando anticuerpos policlonales específicos para anti-fosfotirosina (Upstate), anti-fosfo-p38MAPK (Cell
 20 Signaling Technology), y una MAPK anti-fosfo-p44/42 monoclonal (Cell Signaling Technology). Como control para la carga de proteínas, las transferencias volvieron a sondarse con antisueros policlonales contra ERK (Cell Signaling Technology), p38MAPK (Cell Signaling Technology) o β-actina (NeoMarkers), β-catenina (BD Pharmingen) o β-catenina activa (Upstate).

25 Los datos mostrados en la Figura 23A demuestran que el PVR es fosforilado tras la unión a TIGIT (compárese la banda de tirosina fosforilada tenue observada en las células de control del mismo isotipo frente a las tratadas con TIGIT, mientras que las cantidades totales de PVR siguieron constantes, como se indica por las bandas oscuras de manera equivalente en la porción inferior de la figura). Esto sugirió que la unión de TIGIT inicia una función de señalización mediada por PVR. Se observó fosforilación incrementada del dímero de pERK (91 KD), pero no del monómero (42KD), en las iMDDC tratadas con TIGIT-Fc y TIGIT-Fc-DANA (Figura 23B). A diferencia, no se afectó la actividad de la p38 (Figura 23B). Un informe reciente sugirió que la estimulación de E-cadherina y la inducción de β-catenina activa causaba que las DC derivadas de médula ósea murina maduraran a DC tolerogénicas capaces de
 30 inhibir las respuestas inmunitarias *in vivo* (Jiang, A. et al., Immunity 27, 610-24 (2007)). Aquí, cuando se trataron MDDC humanas con TIGIT-Fc, se indujo la forma activa de la vía de la β-catenina, un efecto no observado con el control del mismo isotipo (Figura 23C).

Estos resultados sugieren que TIGIT, a través de su interacción con PVR, modula la actividad de ERK y así la producción de citocinas mediante MDDC. Para confirmar esta observación, se añadió un inhibidor específico de cinasa ERK junto con TIGIT-Fc a los cultivos de MDDC, y se determinaron los niveles de IL-12 secretada de
 40 aquellos cultivos. La regulación por disminución mediada por TIGIT-Fc de la producción de IL-12p40 se invirtió en presencia del inhibidor de ERK (Figura 24A). Se observó un efecto similar cuando el anticuerpo anti-IL-10 neutralizante se incluyó en el cultivo (véase la Figura 24B). La producción de citocinas modulada por TIGIT de las MDDC también se bloqueó por el anticuerpo anti-TIGIT 10A7 o un anticuerpo anti-PVR bloqueante (Figura 24B). Juntos, estos resultados indicaron que la ligadura de TIGIT-PVR afecta la actividad de cinasas ERK y aumenta la
 45 relación de producción de citosinas IL-10/IL-12 en las DC con respecto a otras citocinas producidas.

Ejemplo 7: Impacto de MDDC moduladas por TIGIT en la activación de células T

Para determinar si el efecto de TIGIT sobre la producción de citocinas de DC tuvo consecuencias funcionales, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la modulación de TIGIT de MDDC en la proliferación de células T y la producción de citocinas. Se cultivaron MDDC tratadas con TIGIT-Fc (maduradas con o bien TNFα o bien sCD40L) con células T en una respuesta MLR como se describió anteriormente, y se monitorizó el efecto sobre las células T. La proliferación de las células T se inhibió un promedio del 50 % ($p < 0,05$) cuando los cultivos que contenían DC modificadas con TIGIT se compararon con DC de control (Figura 25A). Además, se redujeron dos veces los niveles
 55 de IL-2 en los cultivos ($p < 0,01$) (Figura 25B)). Estos datos se correlacionan con la disminución de IL-12 y el aumento en la producción de IL-10 en DC tratadas con TIGIT, como se describió en los ejemplos precedentes. En general, las MDDC modificadas con TIGIT inhibieron las células T, que sugiere que TIGIT puede regular las capacidades funcionales de las DC, una vez las DC están completamente maduras. En particular, la adición de TIGIT-Fc a los cultivos de células MDDC-T inhibió la proliferación de células T, que indica que TIGIT-Fc no necesita estar presente
 60 al inicio de la maduración de DC para modificar las DC.

También se investigó el impacto del tratamiento con TIGIT sobre la expresión de otras moléculas de la superficie celular en MDDC humanas activadas. Se ha sabido que la expresión de ciertos receptores de transcritos similares a la inmunoglobulina (ILT) en las DC se modula en respuesta a la activación de esas células (Velten et al., Eur. J. Immunol. 34: 2800-2811 (2004); Ju et al., Gene 331: 159-164 (2004)). Por ejemplo, la expresión de los receptores de
 65 ILT2 e ILT3 está regulada por disminución en DC activadas por CpG-ADN, y la expresión de ILT2, ILT3, ILT4 e ILT5

está regulada por incremento en DC inducidas por IL-10. Dado que TIGIT estimula la producción de IL-10 en DC, se examinó el impacto de TIGIT sobre la expresión de ILT en DC activadas. Se aislaron iMDDC como se describió anteriormente. Ciertas poblaciones de iMDDC se activaron con TNF o CD40L, y también se trataron con TIGIT-Fc o un control del mismo isotipo. Las células tratadas se clasificaron mediante FACS basándose en su expresión del transcrito 2, 3 6 5 similar a la inmunoglobulina (ILT2, ILT3 o ILT5). Como se muestra en la Figura 26, la activación de las iMDDC regula por disminución la expresión de ILT2, ILT3 e ILT5. A diferencia, la activación y el tratamiento simultáneo con TIGIT-Fc produce una disminución de la regulación por disminución de la expresión de ILT2, ILT3 e ILT5 con respecto a la regulación por disminución observada en iMDDC activadas, pero no tratadas con TIGIT-Fc. Este efecto observado puede deberse a la capacidad de TIGIT para estimular la producción de IL-10 en DC; las DC que expresan IL-10 son conocidas por ser tolerogénicas y expresar niveles más altos de ILT. Sin embargo, la regulación por disminución de los ILT, tales como ILT2, 3 y 5, puede ser también un efecto directo de TIGIT, y proporcionar otro método mediante el cual la TIGIT induce la tolerancia.

Para determinar si los efectos *in vitro* observados del tratamiento con TIGIT en la activación de células T podría trasladarse a una situación *in vivo*, se compararon los efectos del tratamiento con TIGIT-Fc con aquellos de CTLA4-Fc, un inhibidor bien documentado de la respuesta de células T (Linsley, P.S. et al., Science 257, 792-5 (1992)) en una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Brevemente, se inmunizaron por vía subcutánea ratones C57BL/6 de 8-10 semanas de edad en la base de la cola con 100 µg de hemocianina de lapa californiana (KLH) (Sigma) en 100 µl de CFA (Difeo Laboratories). Una cohorte de animales (n=10) se trató en los días 1, 4 y 6 con 100 µg de TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, CTLA-4-Fc murinos o IgG2a anti-ambrosía de control de isotipo negativo mediante inyección intraperitoneal. En el día 6, se midió el espesor de la oreja derecha e izquierda. La oreja derecha se inyectó entonces con 25 µl de solución salina y la oreja izquierda se expuso a 30 µg de KLH en 25 µl de solución salina. En el día 7, se midieron nuevamente los espesores de la oreja derecha e izquierda, y la diferencia entre los espesores del día 7 y el día 6 se definió como la hinchazón de la oreja. La hinchazón de la oreja en las orejas inyectadas con solución salina sola fue inferior a 0,02 mm para cada grupo de tratamiento. Después de la medición de la hinchazón de la oreja, los ratones se sacrificaron y se recogieron los bazo. Se prepararon suspensiones de una sola célula y se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo plano a una densidad de 1×10^6 células/ml (200 µl/pocillo) en DMEM que contenía 10 % de FBS, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células se cultivaron en medio solo o en presencia de varias concentraciones de KLH. Como control positivo para la activación de las células T, las células se cultivaron en pocillos previamente recubiertos con 5 µg/ml de anti-CD3 (BD Biosciences) con 2 µg/ml de anti-CD28 soluble (BD Biosciences). Para el análisis de la proliferación, se añadió 1 µCi de [3 H]timidina (Perkin Elmer) a cada pocillo en un volumen de 50 µl durante las últimas 18 horas de un cultivo de cuatro días, las células se recogieron y se midió la incorporación de [3 H]timidina mediante recuento de centelleo líquido.

Se midió una hinchazón de la oreja significativamente más baja en los ratones tratados con TIGIT-Fc y CTLA4-Fc en comparación con el tratamiento de control, y la potencia fue similar para ambos grupos de tratamiento ($p < 0,0001$ para ambos grupos) (Figura 27A). No hubo diferencia estadística entre TIGIT-Fc y CTLA4-Fc ($p = 0,07$). Significativamente, en los ratones deficientes de IL-10, la TIGIT-Fc no tuvo un efecto sobre las respuestas DTH, a pesar de la inhibición de DTH con CTLA4-Fc ($p = 0,004$), apoyando la función de IL-10 en la función de TIGIT-PVR. TIGIT-Fc-DANA fue similar en sus efectos a la inhibición de DTH que TIGIT-Fc, demostrando que TIGIT-Fc no requirió la reticulación mediada por Fc del PVR. Anti-TIGIT no tuvo efecto sobre DTH (Figura 27C). Se realizaron ensayos para determinar las respuestas de recuperación *in vitro* a KLH en ratones tratados y se demostró que la proliferación, la producción de la citocina IL-2 e IFN γ disminuyó significativamente en ratones no mutantes tratados con TIGIT-Fc, pero no en deficientes de IL-10 (Figuras 27D-G).

Se aislaron DC CD11c $^+$ de los bazo en los ratones de DTH en el fin del estudio (día 7) y se evaluaron el efecto de TIGIT-Fc en la proliferación de DC y los perfiles de citocinas mediante qRT-PCR, como se describió anteriormente. Las células T esplénicas aisladas de TIGIT-Fc y los animales tratados con CTLA4-Fc no proliferaron en respuesta a KLH en los ensayos de recuperación en comparación con los animales de control tratados con el isotipo ($p < 0,001$ para ambos grupos de tratamiento) (Figura 27B). Este resultado indica que la TIGIT puede ser importante durante tanto el cebado de las células T como la fase efectora de las respuestas inmunitarias dirigidas por células T. De manera similar a los datos *in vitro* obtenidos anteriormente de los estudios con MDDC, las células CD11c $^+$ aisladas de los ratones tratados con TIGIT-Fc tuvieron ARNm de IL-10 incrementado ($p < 0,05$) y ARNm de IL-12/23p40 e IL-12p35 disminuido, aunque éstas últimas mediciones no alcanzan significancia estadística ($p = 0,07$ y $0,08$, respectivamente) (Figura 27H). Sin embargo, el tratamiento con TIGIT-Fc solo tuvo un efecto menor sobre la transcripción de IL-12p40/p35 en células CD11c $^+$ derivadas de ratones KO IL-10, que indica que la regulación por disminución mediada por TIGIT de los niveles de ARNm de IL-12p40/p35 es específica y la regulación por incremento mediada por TIGIT de IL-10 se requiere para la regulación por disminución de la citocina proinflamatoria IL-12 en este modelo.

Ejemplo 8: Ratones deficientes en TIGIT

Se generaron ratones inactivados en TIGIT usando técnicas convencionales. Para confirmar la ausencia de un gen de TIGIT funcional en estos ratones, se aislaron células T totales de los bazo de ratones inactivados o no mutantes, y posteriormente se incubaron con anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD28 durante tres días. El ARN total se

aisló de las células usando un kit RNeasy (Qiagen) y se sometió a RT-PCR en tiempo real para medir el ARNm de TIGIT. Los niveles del ARNm de CD96 también se evaluaron como control. Los resultados del estudio demostraron que los ratones inactivados eran deficientes en la expresión de TIGIT.

- 5 Se examinaron poblaciones de células inmunitarias de ganglios linfáticos mesentéricos en ratones inactivados en TIGIT de 9 meses de edad en comparación con ratones no mutantes, usando análisis FACS como se describió en el Ejemplo 3A. Los ratones inactivados en TIGIT mostraron números incrementados de células T CD4⁺ de memoria, mDC, pDC, monocitos, células T CD11c⁺ PVR^{hi} y células B totales en comparación con ratones no mutantes. Las poblaciones de células CD4⁺ intactas y maduras fueron similares entre los ratones inactivados y no mutantes.
- 10 También se encontró que los ratones inactivados tenían elevados números de MZB (B220⁺CD21^{hi}), NKT (DX5⁺CD4⁺ o DX5⁺CD8⁺) y células T CD8⁺ de memoria en el bazo, con respecto a los ratones no mutantes. Este nivel incrementado de células T CD8⁺ de memoria también se observó en ganglios linfáticos mesentéricos y células de parches de Peyer en los ratones inactivados. El aumento en los números de pDC y células de monocito observados en el ganglio linfático mesentérico de los ratones inactivados también se observó en el bazo y los parches de Peyer
- 15 de estos ratones, aunque la diferencia en los niveles con respecto a aquellos en los ratones no mutantes fue menos pronunciada que en el ganglio linfático mesentérico.

- También se investigó la actividad de células T aisladas de los ratones deficientes en TIGIT. Brevemente, se aislaron esplenocitos totales de ratones deficientes en TIGIT de 9 meses de edad y compañeros de camada no mutantes. Se sembraron 10⁶ células de cada tipo de ratones en placas de 96 pocillos de fondo plano y se estimularon con anti-CD3 unido a la placa (10 µg/ml) más anti-CD28 (2 µg/ml). En el segundo día, se recogieron los sobrenadantes y se analizó la producción de citocinas mediante Luminex. Se recogieron células y se sometieron a FACS, clasificándolas mediante la presencia de IFNγ y IL-4 intracelulares. La proliferación celular se midió mediante la incorporación de ³H-timidina, como se describió en el Ejemplo 3A. Se realizaron ensayos de MLR generalmente según los métodos
- 25 descritos en el Ejemplo 4A. Específicamente, se aislaron células T CD4⁺ de los bazos de ratones deficientes en TIGIT o compañeros de camada no mutantes mediante aislamiento negativo (MACS). Los esplenocitos Balb/C agotados en células T se irradiaron a 3000 rad y se usaron como células presentadoras de antígenos. Se estimularon 2 x 10⁵ células T CD4⁺ con 1 µg/ml de anti-CD3 soluble (células T únicamente), o mezcladas con células presentadoras de antígenos alógenas a una relación de 1:2. La proliferación se midió en el tercer día mediante la incorporación de ³H-timidina, como se describió en el Ejemplo 3A. En un segundo experimento, el ensayo con MLR se realizó de manera idéntica, pero las células T CD4⁺ se aislaron de ratones Balb/c y las células presentadoras de antígenos se prepararon a partir de ratones deficientes en TIGIT o de ratones no mutantes.
- 30

- Las células T de ratón deficientes en TIGIT proliferaron de manera similar a las células T de los ratones no mutantes en un ensayo de proliferación convencional (Figura 30A, panel izquierdo). Sin embargo, en presencia de células presentadoras de antígenos, las células T deficientes en TIGIT tuvieron un aumento de la proliferación con respecto a las células T no mutantes (Figura 30A, panel medio). En particular, las células presentadoras de antígenos del bazo de ratones deficientes en TIGIT estimularon la proliferación de células T no mutantes al mismo grado que las células presentadoras de antígenos tomadas de ratones no mutantes (Figura 30A, panel derecho). Combinados,
- 40 estos datos sugieren que las células T se regulan por disminución en la proliferación mediante un mecanismo que involucra la TIGIT expresada en esas células T, en vez de en células presentadoras de antígenos, y confirma además que la actividad de TIGIT en la regulación por disminución de la respuesta de células T. Una proporción mayor de células T de ratones deficientes de TIGIT tuvo niveles de IFNγ intracelulares altos que células T de ratón no mutantes (Figura 30B). Los análisis de producción de citocinas de sobrenadantes de células T deficientes en TIGIT y no mutantes mostraron que la producción/secreción de IFNγ y TNFα aumentó en las células T deficientes de TIGIT con respecto a las células T no mutantes, mientras que los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-12p70
- 45 siguieron consistentes entre las dos poblaciones de células.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> GENENTECH, INC.
Clark, Hilary
Eaton, Dan
Gonzalez, Lino Jr.
- 55 Grogan, Jane
Hackney, Jason A.
Harden, Kristin
Yu, Xin
- 60 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA INMUNIDAD
- <130> P4185R1 WO
- 65 <141> 08-04-2009

ES 2 640 533 T3

<150> US 61/194.271
<151> 26-09-2008

5 <150> US 61/123.530
<151> 09-04-2008

<160> 64

10 <210> 1
<211> 244
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

ES 2 640 533 T3

Met	Arg	Trp	Cys	Leu	Leu	Leu	Ile	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Arg	Gln
1				5					10					15
Ala	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Met	Met	Thr	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr
				20					25					30
Gly	Asn	Ile	Ser	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Leu	Gln	Cys
				35					40					45
His	Leu	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Asn	Trp	Glu
				50					55					60
Gln	Gln	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Ile	Cys	Asn	Ala	Asp	Leu	Gly	Trp
				65					70					75
His	Ile	Ser	Pro	Ser	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Ala	Pro	Gly	Pro	Gly
				80					85					90
Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Asp	Thr	Gly	Glu
				95					100					105
Tyr	Phe	Cys	Ile	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gly
				110					115					120
Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	His	Gly
				125					130					135
Ala	Arg	Phe	Gln	Ile	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Ala	Ala	Thr	Leu
				140					145					150
Val	Val	Ile	Cys	Thr	Ala	Val	Ile	Val	Val	Val	Ala	Leu	Thr	Arg
				155					160					165
Lys	Lys	Lys	Ala	Leu	Arg	Ile	His	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	Leu	Arg
				170					175					180
Arg	Lys	Ser	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Ala	Pro	Ser
				185					190					195
Pro	Pro	Gly	Ser	Cys	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Leu
				200					205					210
Cys	Gly	Glu	Gln	Arg	Gly	Glu	Asp	Cys	Ala	Glu	Leu	His	Asp	Tyr
				215					220					225
Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Gly	Asn	Cys	Ser	Phe	Phe
				230					235					240
Thr	Glu	Thr	Gly											

<210> 2
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> *Macaca mulatta*

<400> 2

ES 2 640 533 T3

Met	Arg	Trp	Cys	Leu	Phe	Leu	Ile	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Arg	Gln	1	5	10	15
Ala	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Met	Met	Thr	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	20	25	30	
Gly	Asn	Ile	Ser	Ala	Lys	Lys	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Leu	Gln	Cys	35	40	45	
His	Leu	Ser	Ser	Thr	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Asn	Trp	Glu	50	55	60	
Gln	His	Asp	His	Ser	Leu	Leu	Ala	Ile	Arg	Asn	Ala	Glu	Leu	Gly	65	70	75	
Trp	His	Ile	Tyr	Pro	Ala	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Ala	Pro	Gly	Pro	80	85	90	
Gly	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Gly	95	100	105	
Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Arg	110	115	120	
Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	His	125	130	135	
Ser	Ala	Arg	Phe	Gln	Ile	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Ala	Met	Met	140	145	150	
Leu	Val	Val	Ile	Cys	Ile	Ala	Val	Ile	Val	Val	Val	Val	Leu	Ala	155	160	165	
Arg	Lys	Lys	Lys	Ser	Leu	Arg	Ile	His	Ser	Val	Glu	Ser	Gly	Leu	170	175	180	
Gln	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gln	Glu	Glu	Gln	Ile	Pro	Ser	Ala	Pro	185	190	195	
Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Cys	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	200	205	210	
Leu	Cys	Gly	Glu	Gln	Gln	Gly	Asp	Asp	Cys	Ala	Glu	Leu	His	Asp	215	220	225	
Tyr	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser	Phe	230	235	240	
Phe	Thr	Glu	Thr	Gly											245			

<210> 3
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 3

ES 2 640 533 T3

Met	Gln	Trp	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ile	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Gly	Gln	1	5	10	15
Ala	Pro	Leu	Pro	Thr	Ser	Gly	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Ile	Met	Thr	20	25	30	
Met	Gly	Asn	Ile	Ser	Ala	Lys	Glu	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Leu	Gln	35	40	45	
Cys	His	Leu	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Asn	Val	Thr	Gln	Val	Asn	Trp	50	55	60	
Glu	Lys	Gln	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Val	His	His	Thr	Asp	Leu	Gly	65	70	75	
Trp	His	Ile	Tyr	Pro	Ala	Phe	Arg	Glu	Arg	Val	Ala	Pro	Gly	Pro	80	85	90	
Asn	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	95	100	105	
Glu	Tyr	Leu	Cys	Thr	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Asp	Gly	Ile	Tyr	Arg	110	115	120	
Gly	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Arg	125	130	135	
Ser	Ala	Ala	Phe	Gln	Ile	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Ala	Ser	Val	140	145	150	
Leu	Ala	Val	Ile	Cys	Val	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Leu	Trp	Thr	155	160	165	
Arg	Lys	Lys	Lys	Cys	Arg	Arg	Val	His	Cys	Gly	Glu	Ser	Gly	Leu	170	175	180	
Arg	Thr	Met	Thr	Tyr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gln	Ser	Pro	Cys	Ile	Leu	185	190	195	
Ser	Ser	Thr	Gly	Arg	Ala	Ile	Gln	Val	Glu	Met	Val	Pro	Val	Gly	200	205	210	
Leu	Tyr	Thr	Glu	Gln	Arg	Ala	Asp	Asp	Tyr	Ala	Glu	Pro	His	Asp	215	220	225	
Tyr	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	Phe	Ser	Phe	230	235	240	
Leu	Ala	Glu	Thr	Gly	245													

<210> 4
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

ES 2 640 533 T3

Met	His	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Gln	Gly	Leu	Ile	Gln	1	5	10	15
Ala	Ala	Phe	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Ile	Asp	Thr	20	25	30	
Lys	Arg	Asn	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Leu	Gln	35	40	45	
Cys	His	Phe	Ser	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu	Val	Thr	Gln	Val	Asp	Trp	50	55	60	
Lys	Gln	Gln	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ser	Val	Asp	Leu	Gly	65	70	75	
Trp	His	Val	Ala	Ser	Val	Phe	Ser	Asp	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Pro	80	85	90	
Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Gly	95	100	105	
Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ile	Tyr	Lys	110	115	120	
Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Gln	Phe	125	130	135	
Gln	Thr	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	140	145	150	
Ile	Cys	Leu	Met	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Arg	Lys	Lys	155	160	165	
Ser	Ile	Arg	Met	His	Ser	Ile	Glu	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg	Thr	Glu	170	175	180	
Ala	Glu	Pro	Gln	Glu	Trp	Asn	Leu	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	185	190	195	
Ser	Pro	Val	Gln	Thr	Gln	Thr	Ala	Pro	Ala	Gly	Pro	Cys	Gly	Glu	200	205	210	
Gln	Ala	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ala	Asp	Pro	Gln	Glu	Tyr	Phe	Asn	Val	215	220	225	
Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Thr	230	235	240	

Gly

<210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 640 533 T3

```

Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn
 1              5              10              15
Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu
              20              25              30
Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln
              35              40              45
Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile
              50              55              60
Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly
              65              70              75
Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe
              80              85              90
Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Ala Tyr Thr Gly Arg Ile
              95              100             105
Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser
              110

```

<210> 6
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln
 1              5              10              15
Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu
              20              25              30
Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp
              35              40              45
Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr
              50              55              60
Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
              65              70              75
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe
              80              85              90
Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val
              95              100             105
Thr Phe Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val
              110             115             120
Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys
              125              130

```

ES 2 640 533 T3

<210> 7
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Phe	Val	Lys	Gly	Val	Trp	Glu	Lys	Thr	Val	Asn	Thr	Glu	Glu	Asn
1				5					10					15
Val	Tyr	Ala	Thr	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Thr
				20					25					30
Gln	Thr	Val	Gly	Phe	Phe	Val	Gln	Met	Gln	Trp	Ser	Lys	Val	Thr
				35					40					45
Asn	Lys	Ile	Asp	Leu	Ile	Ala	Val	Tyr	His	Pro	Gln	Tyr	Gly	Phe
				50					55					60
Tyr	Cys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Pro	Cys	Glu	Ser	Leu	Val	Thr	Phe	Thr
				65					70					75
Glu	Thr	Pro	Glu	Asn	Gly	Ser	Lys	Trp	Thr	Leu	His	Leu	Arg	Asn
				80					85					90
Met	Ser	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Arg	Tyr	Glu	Cys	Met	Leu	Val	Leu
				95					100					105
Tyr	Pro	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Lys	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Gln
				110					115					120
Thr	His	Val	Thr	Ala	Asp	Glu	Trp	Asn	Ser	Asn				
				125					130					

10

<210> 8
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 8

Leu	Glu	Thr	Gly	Ala	Gln	Asp	Val	Arg	Val	Gln	Val	Leu	Pro	Glu
1				5					10					15
Val	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Pro	Cys	His	Leu
				20					25					30
Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Gly	Leu	Tyr	Ile	Ser	Leu	Val	Thr	Trp	Gln
				35					40					45
Arg	Pro	Asp	Ala	Pro	Ala	Asn	His	Gln	Asn	Val	Ala	Ala	Phe	His

ES 2 640 533 T3

	50		55		60									
Pro	Lys	Met	Gly	Pro	Ser	Phe	Pro	Ser	Pro	Lys	Pro	Gly	Ser	Glu
			65						70					75
Arg	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Ala	Lys	Gln	Ser	Thr	Gly	Gln	Asp	Thr
			80						85					90
Glu	Ala	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	His	Gly	Leu	Thr
			95						100					105
Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Glu	Phe	Ala	Thr	Phe	Pro
				110					115					120
Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Gly	Met	Thr	Trp	Leu	Arg	Val	Ile	Ala	Lys
				125					130					135
Pro	Lys	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Gln	Lys						
				140										

<210> 9
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Phe	Leu	Pro	Gly	Val	His	Ser	Gln	Val	Val	Gln	Val	Asn	Asp	Ser
1				5					10					15
Met	Tyr	Gly	Phe	Ile	Gly	Thr	Asp	Val	Val	Leu	His	Cys	Ser	Phe
				20					25					30
Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Ser	Val	Lys	Ile	Thr	Gln	Val	Thr	Trp	Gln
				35					40					45
Lys	Ser	Thr	Asn	Gly	Ser	Lys	Gln	Asn	Val	Ala	Ile	Tyr	Asn	Pro
				50					55					60
Ser	Met	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Ala	Pro	Tyr	Arg	Glu	Arg	Val	Glu
				65					70					75
Phe	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Asp	Gly	Thr	Ile	Arg	Leu	Ser	Arg
				80					85					90
Leu	Glu	Leu	Glu	Asp	Glu	Gly	Val	Tyr	Ile	Cys	Glu	Phe	Ala	Thr
				95					100					105
Phe	Pro	Thr	Gly	Asn	Arg	Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Leu	Thr	Val	Met
				110					115					120
Ala	Lys	Pro	Thr	Asn	Trp	Ile	Glu	Gly	Thr	Gln				
				125					130					

<210> 10
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 640 533 T3

<400> 10

Arg	Leu	Cys	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Pro	Ile	Ile	Val	Glu	Pro	His
1				5					10					15
Val	Thr	Ala	Val	Trp	Gly	Lys	Asn	Val	Ser	Leu	Lys	Cys	Leu	Ile
				20					25					30
Glu	Val	Asn	Glu	Thr	Ile	Thr	Gln	Ile	Ser	Trp	Glu	Lys	Ile	His
				35					40					45
Gly	Lys	Ser	Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Val	His	His	Pro	Gln	Tyr	Gly
				50					55					60
Phe	Ser	Val	Gln	Gly	Glu	Tyr	Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Phe	Lys	Asn
				65					70					75
Tyr	Ser	Leu	Asn	Asp	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	His	Asn	Ile	Gly	Phe
				80					85					90
Ser	Asp	Ser	Gly	Lys	Tyr	Ile	Cys	Lys	Ala	Val	Thr	Phe	Pro	Leu
				95					100					105
Gly	Asn	Ala	Gln	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Val	Glu	Pro
				110					115					120
Thr	Val	Ser	Leu	Ile	Lys	Gly	Pro							
				125										

5 <210> 11
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 11

ES 2 640 533 T3

Phe	Thr	Gly	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	Thr	Ser	Asp	Val	1	5	10	15
Val	Thr	Val	Val	Leu	Gly	Gln	Asp	Ala	Lys	Leu	Pro	Cys	Phe	Tyr	20	25	30	
Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	Glu	Gln	Val	Gly	Gln	Val	Ala	Trp	Ala	Arg	35	40	45	
Val	Asp	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Leu	His	Ser	50	55	60	
Lys	Tyr	Gly	Leu	His	Val	Ser	Pro	Ala	Tyr	Glu	Gly	Arg	Val	Glu	65	70	75	
Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Asn	Pro	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	80	85	90	
Arg	Asn	Ala	Val	Gln	Ala	Asp	Glu	Gly	Glu	Tyr	Glu	Cys	Arg	Val	95	100	105	
Ser	Thr	Phe	Pro	Ala	Gly	Ser	Phe	Gln	Ala	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	110	115	120	
Val	Leu	Val	Pro	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn	Pro	Gly	Pro	125	130				

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 640 533 T3

Leu	Leu	His	Val	Tyr	Arg	Ala	Leu	Cys	Glu	Glu	Val	Leu	Trp	His
1				5					10					15
Thr	Ser	Val	Pro	Phe	Ala	Glu	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Cys	Val	Tyr
				20					25					30
Pro	Ser	Met	Gly	Ile	Leu	Thr	Gln	Val	Glu	Trp	Phe	Lys	Ile	Gly
				35					40					45
Thr	Gln	Gln	Asp	Ser	Ile	Ala	Ile	Phe	Ser	Pro	Thr	His	Gly	Met
				50					55					60
Val	Ile	Arg	Lys	Pro	Tyr	Ala	Glu	Arg	Val	Tyr	Phe	Leu	Asn	Ser
				65					70					75
Thr	Met	Ala	Ser	Asn	Asn	Met	Thr	Leu	Phe	Phe	Arg	Asn	Ala	Ser
				80					85					90
Glu	Asp	Asp	Val	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Cys	Ser	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Pro
				95					100					105
Gln	Gly	Thr	Trp	Gln	Lys	Val	Ile	Gln	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Ser
				110					115					120
Phe	Glu	Ala	Ala	Val	Pro	Ser	Asn							
				125										

<210> 13
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

5

ES 2 640 533 T3

Cys	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Val	Pro	Thr	Glu	Pro
1				5					10					15
Leu	Ser	Thr	Pro	Leu	Gly	Lys	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Cys	Thr	Tyr
				20					25					30
Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Ser	Phe	Ala	Leu	Glu	Trp	Ser	Phe	Val
				35					40					45
Gln	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Ile	Leu	Tyr	Phe
				50					55					60
Thr	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Lys	Ser	Lys	Arg	Val
				65					70					75
Ser	Leu	Leu	Gln	Asn	Pro	Pro	Thr	Val	Gly	Val	Ala	Thr	Leu	Lys
				80					85					90
Leu	Thr	Asp	Val	His	Pro	Ser	Asp	Thr	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln
				95					100					105
Val	Asn	Asn	Pro	Pro	Asp	Phe	Tyr	Thr	Asn	Gly	Leu	Gly	Leu	Ile
				110					115					120
Asn	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Asn	Pro				

125

130

<210> 14
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

ES 2 640 533 T3

Thr	Gly	Val	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Ser	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15
Ile	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Pro	Cys	Thr	Phe
				20					25					30
Thr	Thr	Ser	Ala	Ala	Leu	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	Ile	Trp	Met	Val
				35					40					45
Thr	Pro	Leu	Ser	Asn	Ala	Asn	Gln	Pro	Glu	Gln	Val	Ile	Leu	Tyr
				50					55					60
Gln	Gly	Gly	Gln	Met	Phe	Asp	Gly	Ala	Pro	Arg	Phe	His	Gly	Arg
				65					70					75
Val	Gly	Phe	Thr	Gly	Thr	Met	Pro	Ala	Thr	Asn	Val	Ser	Ile	Phe
				80					85					90
Ile	Asn	Asn	Thr	Gln	Leu	Ser	Asp	Thr	Gly	Thr	Tyr	Gln	Cys	Leu
				95					100					105
Val	Asn	Asn	Leu	Pro	Asp	Ile	Gly	Gly	Arg	Asn	Ile	Gly	Val	Thr
				110					115					120
Gly	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	His	Cys	Gln	Ile
				125					130					135

Gln

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Leu	Gly	Leu	Glu	Gly	Gln	Gly	Ile	Val	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Val
1				5					10					15
Leu	Gln	Ala	Pro	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Gln	Cys	His	Tyr
				20					25					30
Arg	Leu	Gln	Asp	Val	Lys	Ala	Gln	Lys	Val	Trp	Cys	Arg	Phe	Leu
				35					40					45
Pro	Glu	Gly	Cys	Gln	Pro	Leu	Val	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Arg	Arg
				50					55					60
Ala	Pro	Ala	Gly	Arg	Arg	Thr	Phe	Leu	Thr	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly
				65					70					75
Leu	Leu	Gln	Val	Glu	Met	Val	Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Asp	Ala	Gly
				80					85					90
Glu	Tyr	Gly	Cys	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Gln	Ile	Leu
				95					100					105
His	Arg	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	
				110					115					

ES 2 640 533 T3

<210> 16
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

```

Asn Phe Trp Asn Leu Pro Ile Thr Ala Gln Val Thr Ile Glu Ala
 1              5              10              15

Leu Pro Pro Lys Val Ser Glu Gly Lys Asp Val Leu Leu Leu Val
              20              25              30

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

Gln Leu Met Asp Leu Tyr His Tyr Ile Thr Ser Tyr Val Val Asp
              50              55              60

Gly Gln Ile Asn Ile Tyr Gly Pro Ala Tyr Thr Gly Arg Glu Thr
              65              70              75

Val Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Arg Glu
              80              85              90

Asp Ala Gly Ser Tyr Thr Leu His Ile Ile Lys Arg Gly Asp Arg
              95              100             105

Thr Arg Gly Val Thr Gly Tyr Phe Thr Phe Asn Leu Tyr Leu Lys
              110             115             120

Leu Pro Lys Pro
  
```

10

<210> 17
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 17

```

Ser Ala Cys Gly Gly Cys Val Glu Val Asp Ser Glu Thr Glu Ala
 1              5              10              15

Val Tyr Gly Met Thr Phe Lys Ile Leu Cys Ile Ser Cys Lys Arg
              20              25              30

Arg Ser Glu Thr Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Trp Thr Phe Arg
              35              40              45

Gln Lys Gly Thr Glu Glu Phe Val Lys Ile Leu Arg Tyr Glu Asn
              50              55              60

Glu Val Leu Gln Leu Glu Glu Asp Glu Arg Phe Glu Gly Arg Val
              65              70              75
  
```

ES 2 640 533 T3

Val	Trp	Asn	Gly	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Asp	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser
				80					85					90
Ile	Phe	Ile	Thr	Asn	Val	Thr	Tyr	Asn	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	Glu
				95				100						105
Cys	His	Val	Tyr	Arg	Leu	Leu	Phe	Phe	Glu	Asn	Tyr	Glu	His	Asn
				110					115					120
Thr	Ser	Val	Val	Lys	Lys	Ile	His	Ile	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Gly
				125					130					135
Glu														

<210> 18
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

Ile	Gly	Phe	Gly	Ile	Ser	Gly	Arg	His	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Thr
1				5					10					15
Val	Ala	Ser	Ala	Gly	Asn	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Gln	Ser	Cys
				20					25					30
Thr	Phe	Glu	Pro	Asp	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Gln	Trp
				35					40					45
Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Val	His	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly
				50					55					60
Lys	Asp	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Gly	Arg	Thr
				65					70					75
Ala	Val	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg
				80					85					90
Leu	Lys	Asn	Val	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Lys	Cys	Tyr
				95					100					105
Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Gly	Lys	Gly	Asn	Ala	Asn	Leu	Glu	Tyr	Lys
				110					115					120
Thr	Gly	Ala	Phe	Ser	Met	Pro	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn	
				125					130					

<210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 19

ES 2 640 533 T3

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val
1 5 10 15

Val Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly

20

25

<210> 20

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 20

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn
1 5 10 15

Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu
20 25

15 <210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> la secuencia es sintetizada

<400> 21

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

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr
20 25 30

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ile Arg
50 55 60

Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly
80 85 90

Gln Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr Phe Gly
95 100 105

Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
110

25

<210> 22

ES 2 640 533 T3

<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 22

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Lys	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	20	25	30	
Ser	Phe	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Val	Ala	Phe	Ile	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Val	Phe	Tyr	50	55	60	
Ala	Asp	Ala	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	65	70	75	
Lys	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Asn	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Pro	Leu	Gly	His	Asn	Thr	95	100	105	
Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	110	115			

10

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

20 <400> 23

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Glu	Asn	Leu	1	5	10	15
Leu	Ala																	

25

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 24

ES 2 640 533 T3

Ala Ser Ile Arg Phe Thr
5

5 <210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia es sintetizada
10
<400> 25

Gln Gln Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr
5

15 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Thr Met His
5 10

25

30 <210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia es sintetizada
35 <400> 27

Phe Ile Arg Ser Gly Ser Gly Ile Val Phe Tyr Ala Asp Ala Val
1 5 10 15

Arg Gly

40 <210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 28

Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser
5 10

50
<210> 29

ES 2 640 533 T3

<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 29

```

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

Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
              20              25              30

Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro
              35              40              45

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Phe Gly Ile Ser Asn Arg Phe
              50              55              60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
              65              70              75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met
              80              85              90

Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Pro Thr Phe Gly Pro
              95              100             105

Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
              110

```

10

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

20 <400> 30

ES 2 640 533 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Thr	Ser	Met	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	
				20					25					30	
Gly	His	Leu	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Ile	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	
				80					85					90	
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ala	
				95					100					105	
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
				110					115						

<210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 31

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Asn	Ser	Tyr	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	
1				5					10					15	
Ser															

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 32

Gly	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	
				5			

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

ES 2 640 533 T3

<400> 33

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Pro Thr
5

5 <210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 34

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His Leu Met Asn
5 10

15 <210> 35
<211> 17
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 35

25 Leu Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15
Lys Gly

30 <210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

35 <400> 36

Gly Leu Arg Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
5 10

40 <210> 37
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

<400> 37
tttytggtcc accktggtgc tgc 23

50 <210> 38

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 38
 ctggacaggg atccagagtt cc 22
 10 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 39
 cargtcamdgc tcaactgctc ag 22
 20 <210> 40
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 30 <400> 40
 gtagaagttg ttcaagaag 19
 <210> 41
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 40 <400> 41
 gaggcacctc cagatgttaa c 21
 <210> 42
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 50 <400> 42
 ctgctcactg gatggtggga ag 22
 <210> 43
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 43

gaagatggat acagttggtg c 21

5 <210> 44
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> la secuencia es sintetizada
<400> 44

gattcaaatc tcaattatat aatccgaata tgtttaccgg ctggtcatg 50

gacccccccc ccccdn 66

15 <210> 45
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> la secuencia es sintetizada
<400> 45
gaattcccc cccccccc 19

25 <210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> la secuencia es sintetizada
<400> 46
ctcatggacc ccccccccc 20

35 <210> 47
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> la secuencia es sintetizada

45 <400> 47
aaatataata ccccccccc cccc 24

50 <210> 48
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> la secuencia es sintetizada
<400> 48
aaatataata ccccccc 17

<210> 49

ES 2 640 533 T3

<211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 49
 ctcatggacc ccccc 15

10

<210> 50
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

20

<400> 50

gatgttgtgt tgactcaaac tccactctcc ctgtctgtca gctttggaga 50
 tcaagtttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgta aacagttatg 100
 ggaacacctt tttgtcttgg tacctgcaca agcctggcca gtctccacag 150
 ctctcatctt ttgggatttc caacagattt tctgggggtgc cagacagggt 200
 cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac actcaagatc agcacaataa 250
 agcctgagga cttgggaatg tattactgct tacaaggtag gcatcagcct 300
 cccacgttcg gtccctgggac caagctggag gtgaaa 336

25

<210> 51
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

30

<400> 51

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggaacttc 50
 aatgaagata tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact ggccatctta 100
 tgaactgggt gaagcagagc catggaaaga accttgagtg gattggactt 150
 attattcctt acaatggttg tacaagctat aaccagaagt tcaagggcaa 200
 ggccacattg actgtagaca agtcatccag cacagcctac atggagctcc 250
 tcagtctgac ttctgatgac tctgcagtct atttctgttc aagaggcctt 300
 aggggcttct atgctatgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt 350
 ctctca 357

5
 <210> 52
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 52
 tgccagggtc cagattcca 19
 10
 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 53
 acgatgactg ctgtgcagat g 21
 20
 <210> 54
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 54
 agccatggcc gcgacgct 18
 30
 <210> 55
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 55
 acatctaccg aagtccaatg ca 22
 40
 <210> 56
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 56
 ggaattgtaa tagcgatcct gage 24
 50
 <210> 57
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 60

<400> 57
 tgcacgcaga cattcccgcc t 21

5 <210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 58
 tctgaatcat aatggcgaga ct 22

15 <210> 59
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 59
 tcactctgta agggctctgct tct 23

25 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada

35 <400> 60
 tgcgccagaa acctcctgtg g 21

<210> 61
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada

45 <400> 61
 tgagttcaga gtcctaaga gagt 24

<210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada

55 <400> 62
 aaaggatctc cctggtttct c 21

60 <210> 63
 <211> 26
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia es sintetizada
 5
 <400> 63
 tccaagacc catgagttc ttcaca 26
 <210> 64
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> la secuencia es sintetizada
 <400> 64
 gaartarccc ttgaccaggc 20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso en un método para la modulación terapéutica de la función y/o la actividad del sistema inmunitario, comprendiendo el método la administración del anticuerpo anti-TIGIT, o del fragmento de unión a TIGIT del mismo, a un cuerpo humano o animal, en donde el anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, inhiben la unión de TIGIT a uno o más de PVRL2, PVRL3 y PVR, y en donde el anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, comprenden una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende SEQ ID NO: 23, una HVR-L2 que comprende SEQ ID NO: 24 y una HVR-L3 que comprende SEQ ID NO: 25, y una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende SEQ ID NO: 26, una HVR-H2 que comprende SEQ ID NO: 27 y una HVR-H3 que comprende SEQ ID NO: 28.
2. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según la reivindicación 1, en el que la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21.
3. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.
4. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según las reivindicaciones 2 o 3, en el que la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.
5. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según la reivindicación 4, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.
6. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, inhiben la unión de TIGIT a PVR.
7. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, inhiben la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR.
8. El anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde en el método la modulación es estimular la proliferación de una o más células inmunitarias o aumentar la liberación de citocinas proinflamatorias por una o más células inmunitarias.
9. El anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo anti-TIGIT, o el fragmento de unión a TIGIT del mismo, está seleccionados de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo heteroconjugado y una inmunotoxina.

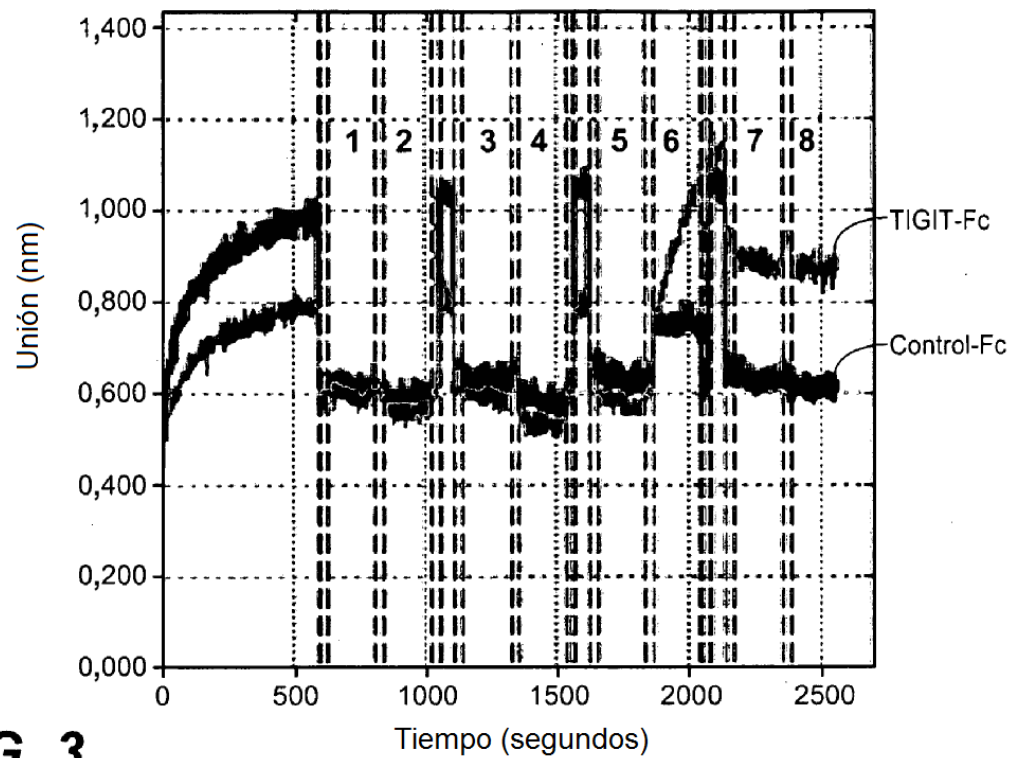
Humano	MRWCLLLIWAQGLRQAPLAS-GMMTG	TIET	TGNISAEKGGSI	ILQCHLSS	49	SEQ ID NO: 1
Rhesus	MRWCLFLIWAQGLRQAPLAS-GMMTG	TIET	TGNISAKKGGSV	ILQCHLSS		SEQ ID NO: 2
Perro	MQWYLLLIWAQGLQAPLPTSGAVSGR	IMTM	GNISAKEGGSV	TLQCHLSS		SEQ ID NO: 3
Ratón	MHGWL	LLVWVQGL	IQAAFLATGATG	ITDKRNNISAE		SEQ ID NO: 4
	TTAQVTQVNWEQDDQ-LLAI	CNADLGWHIS	PSFKDRVAPGP	GLGLTLQSL	98	SEQ ID NO: 1
	TTAQVTQVNWEQH	DHSL	LLAI	RNAELGWHIYP	AFKDRVAPGP	
	TTANVTQVNWEK	QDDQ-LLAV	HHTDLGWHIYP	AFRE	RVAPGPNLGLTLQSL	
	DTAEVTQVD	WKQDDQ-LLAI	YSVDLGWHV	ASVFS	DRVVPGPS	
	TVNDTG	EYFC	IYHTYP	DGTY	TGRIFLEV	ESSVAEHGAR
	TMNDTG	EYFC	TYHTYP	DGTY	RGRI	FLEV
	TRNDTG	EYLC	TYHTYP	DGTY	RGTF	FLEV
	TMNDTG	EYFC	TYHTYP	GGIY	KGRIFL	KVQ
	TLVVIC	TAVI	VVVA	LTRKKK	KALRI	HSV
	MLVVIC	I	AVI	VVVA	LARKKK	SLRI
	VLA	VC	AVI	LGGL	WTRKKK	CCR
	VLGL	IC	LM	VTG	VT	VL
	SCVQ	AE	EA	AP	AG	LC
	SCVQ	AE	EA	AP	AG	LC
	RA	IQ	VE	M	V	PP
	SPVQ	TQ	T	A	P	A

FIG. 1

VSIG2	63	QPGKPISESHPI	LYFTNGHLYPTG-SKSKRVSL	LQNPP	TVG	---	V	103	SEQ ID NO: 13	
IGSF11	62	PLSNAN-QPEQV	ILYQGGQMF	FDGAPRFHGRVGF	FTGTM	PAT	---	101	SEQ ID NO: 14	
TREML1	55	LPEG- ---CQPL	VSSAVDRRAPAG- ---RR	TFL	TDLGG	---	L	86	SEQ ID NO: 15	
PSG5	71	---Q- ---LMDL	YHYITSYV	VDGQINIYGP	AYTGRE	TVYS	---	104	SEQ ID NO: 16	
SCN1B	61	QKGT EEFVKIL	RYENEVLQLEDE-RFEG	RVVW	NGSRG	TKD	---	103	SEQ ID NO: 17	
B7-H4	75	GVLG- ---LV	HEFKEGKDELSEQDEMFRGR	TAV	FADQ	VIVG	---	112	SEQ ID NO: 18	
T-FY-P-X-G										
TIGT	93	--LTLQSLT	VND:EGNYT	CFIYHT	YFP	--D	GAYTGRIF	LEVLES	129	SEQ ID NO: 5
PVR	106	ASLRM:FGLR	VE:D:EGNYT	CLFV	TFP	--Q	SRSDIWL	RLVLA	153	SEQ ID NO: 6
CD96	101	WTLHLRNMS	CSVSGRYECML	VLYP	--E	GIQTKIYNLL	IQTHV	TADWNSN	148	SEQ ID NO: 7
PVRL2	123	ATLALHGLT	VE:D:EGNYT	CEFA	TFP	--K	SVRGMTWL	RVIA	170	SEQ ID NO: 8
PVRL1	107	GTIRLSRLE	LE:D:EGVYI	CEFA	TFP	--T	GNRSQLNLL	TVMA	154	SEQ ID NO: 9
PVRL3	131	ATITLHNIGFS	D:SGKYI	CKAV	TFP	--L	GNAQSSSTV	TVLVEPT	178	SEQ ID NO: 10
PVRL4	110	GSVLLRNAVQA	D:EGEYE	CRVST	TFP	--A	GSFQARLR	RLVLP	157	SEQ ID NO: 11
CD226	91	M:TLFFRNASE	D:VGYY	YSCSL	YTFP	--Q	GTWQKVIQ	VVQSD	137	SEQ ID NO: 12
VSIG2	104	ATLKLTD	VHPSD:TG	TYL	CQV	NNPP	DFYTN	GLGLIN	148	SEQ ID NO: 13
IGSF11	102	VSIFIN	TLQSLS:DG	TYL	CQV	NNPP	DIGRN	IGVTGL	151	SEQ ID NO: 14
TREML1	87	LQVEM:VTLQ	EE:D:AGEYGC	MVDGAR	--G	QILHRVSLN	ILPPE	EEEE	129	SEQ ID NO: 15
PSG5	105	ASLLIQNV	TRE:D:AGSYT	LHI	IKRG	DRTRGV	TYFTFN	LYLKL	149	SEQ ID NO: 16
SCN1B	104	LSIFI	TNVTYNH	SGDYE	CHVY	RLFF	ENYEHNTSV	VKKIH	151	SEQ ID NO: 17
B7-H4	113	ASLRLKKNVQL	T:D:AGTY	KCYI	IT	SKG-KGN	ANLEYK	TGAF	160	SEQ ID NO: 18

● Huella del marco V
□ Huella de la familia de PVR

FIG. 2B



Carga de ligandos de unión hTIGITecd-Fc a 100 nM

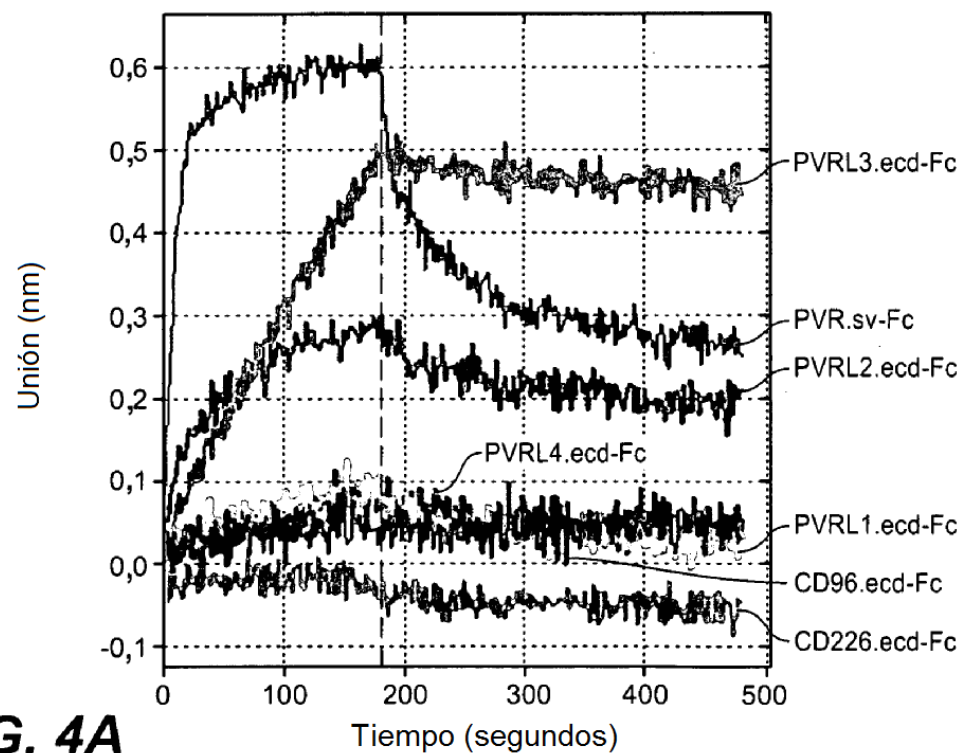


FIG. 4B

FIG. 4B-1	FIG. 4B-2
FIG. 4B-3	FIG. 4B-4
FIG. 4B-5	FIG. 4B-6

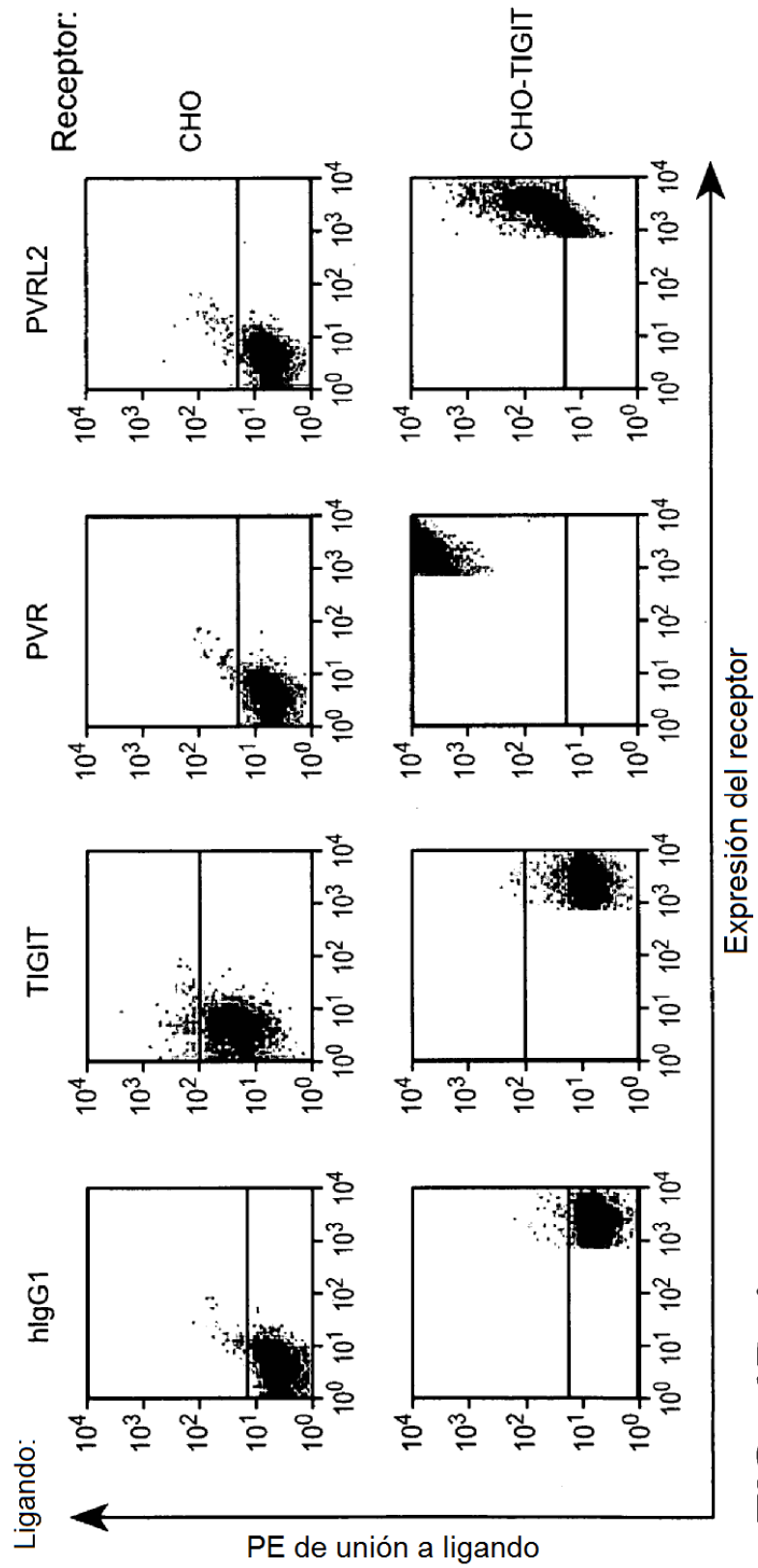


FIG. 4B-1

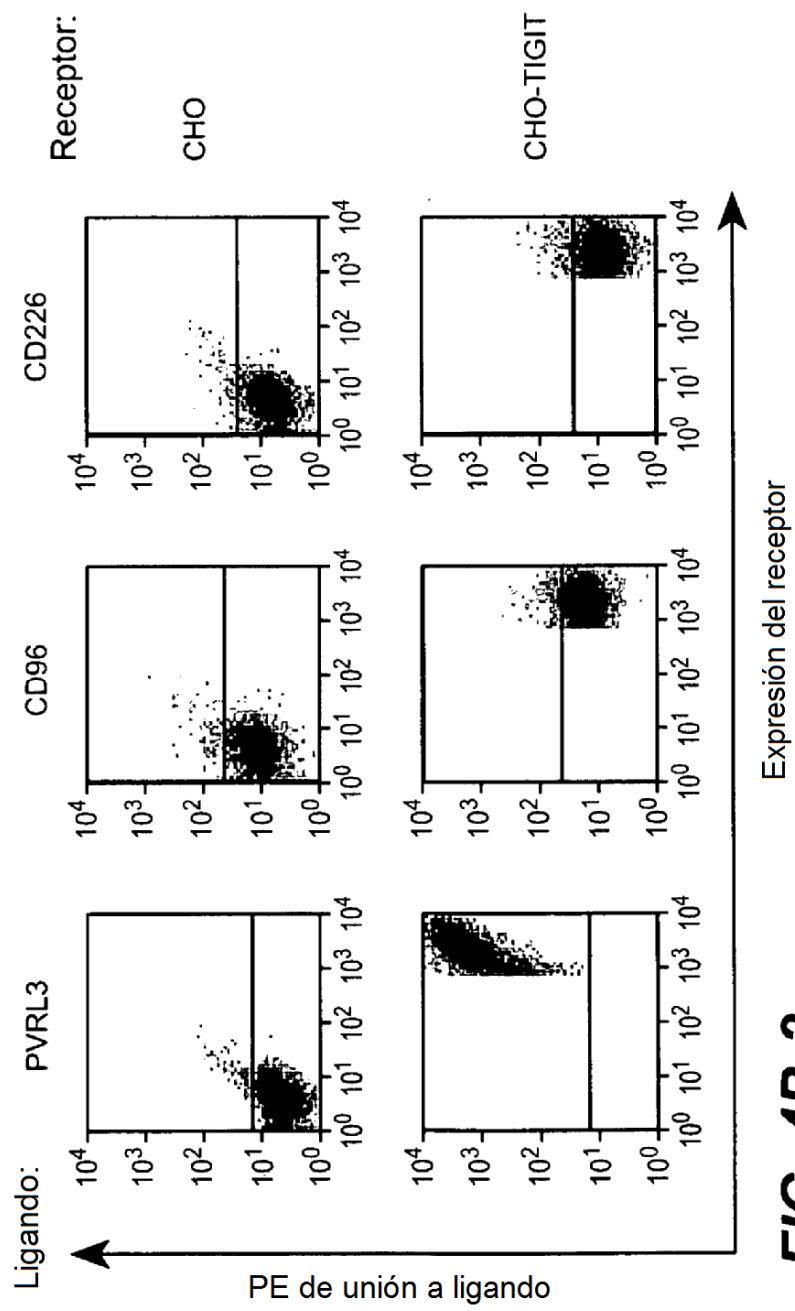


FIG. 4B-2

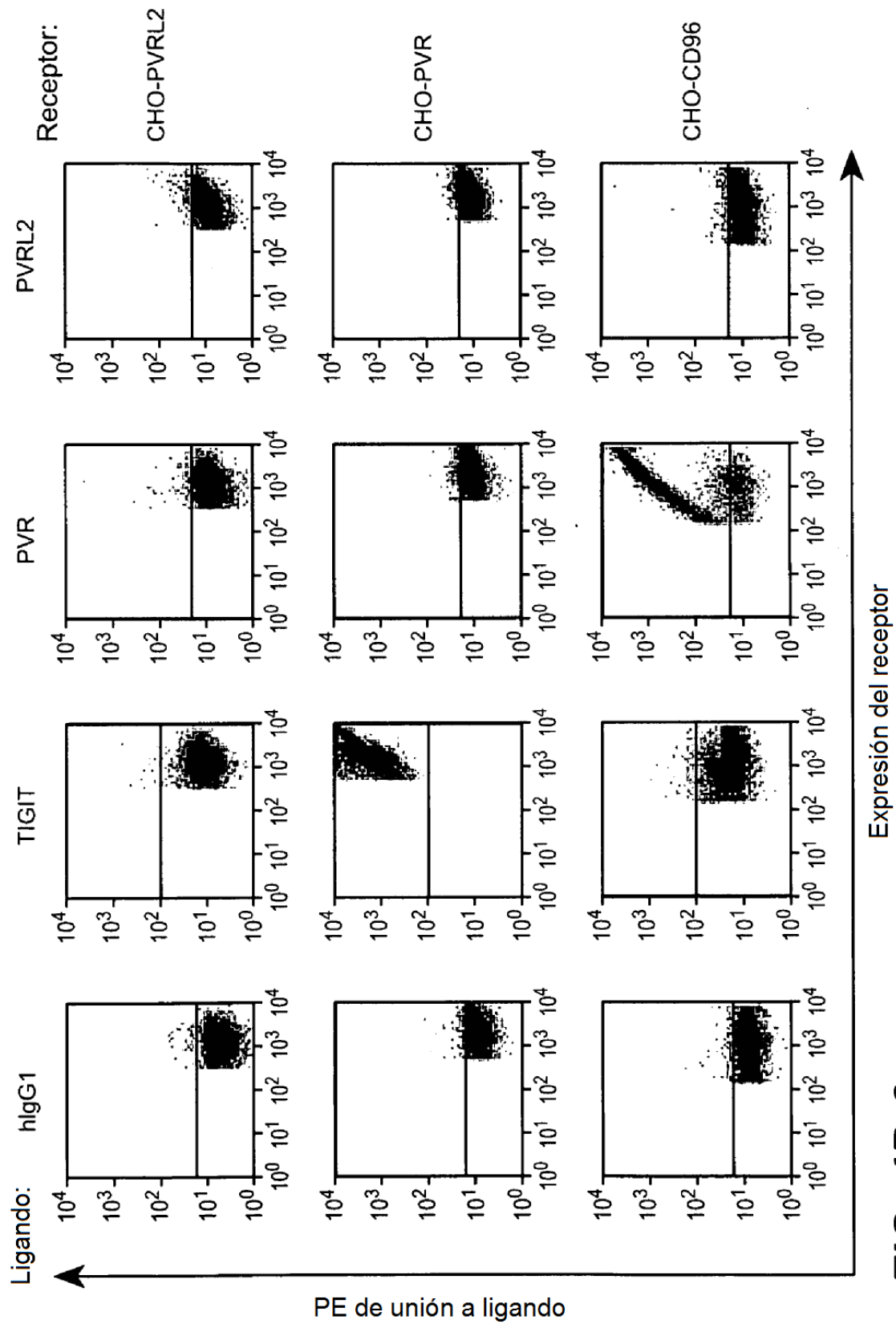


FIG. 4B-3

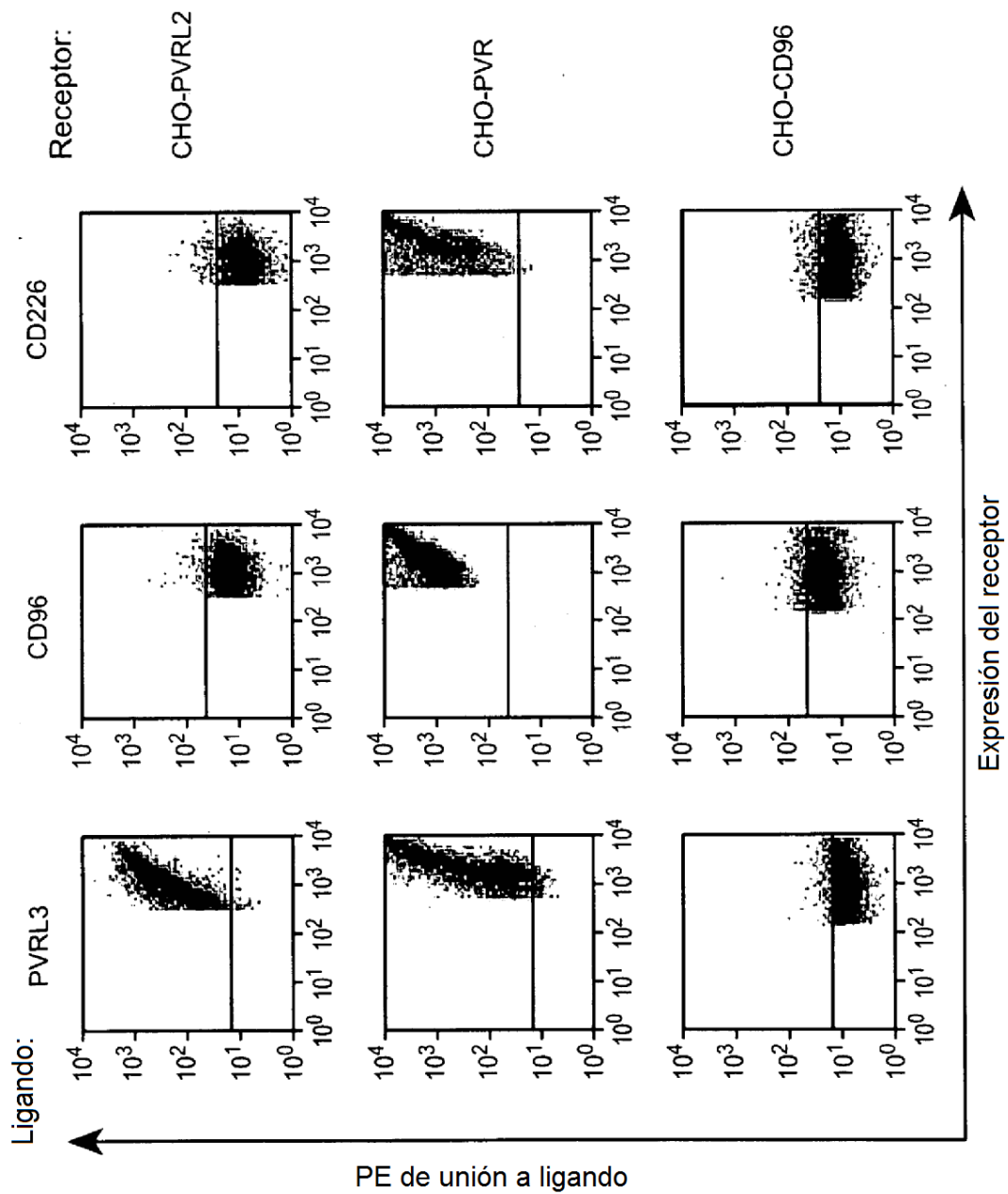


FIG. 4B-4

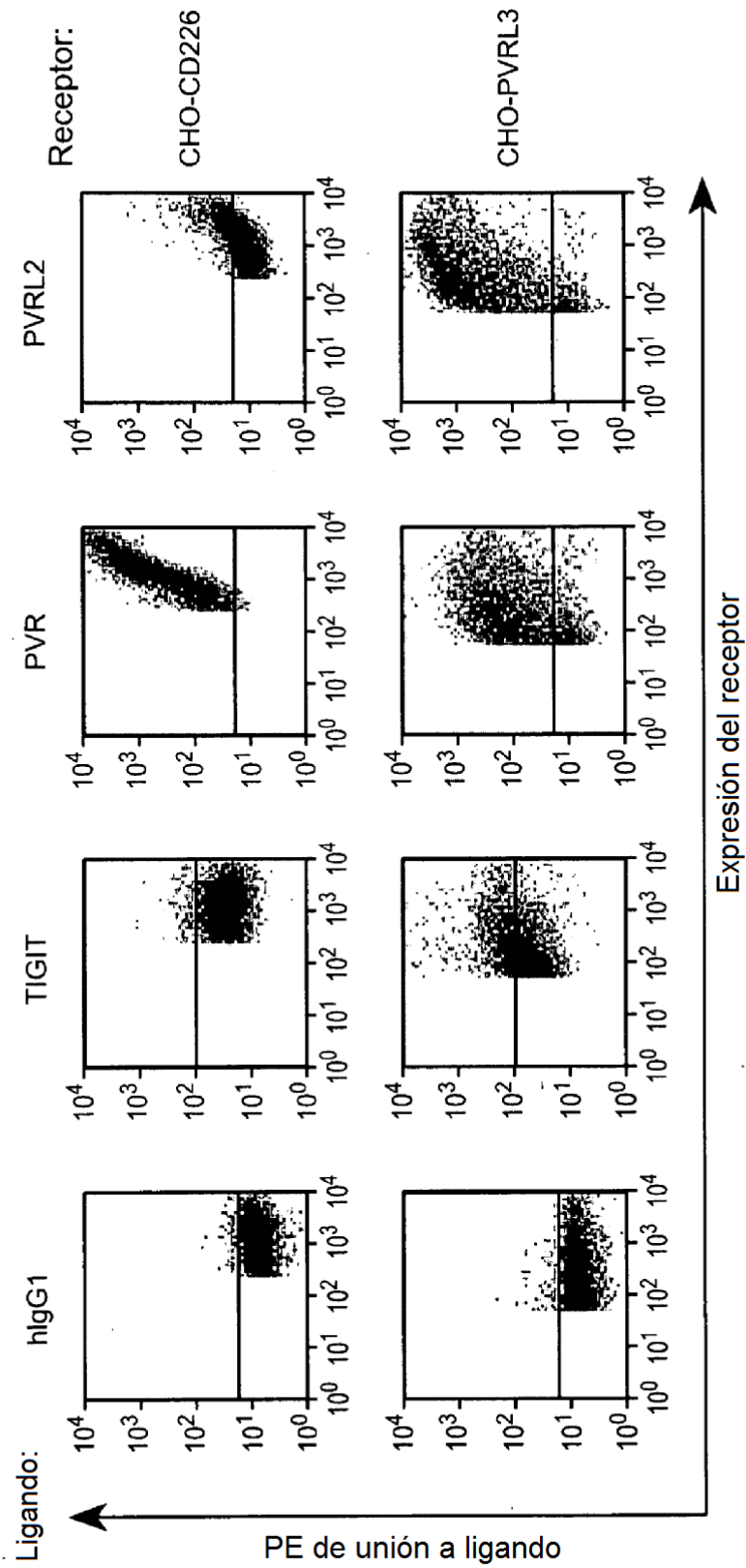


FIG. 4B-5

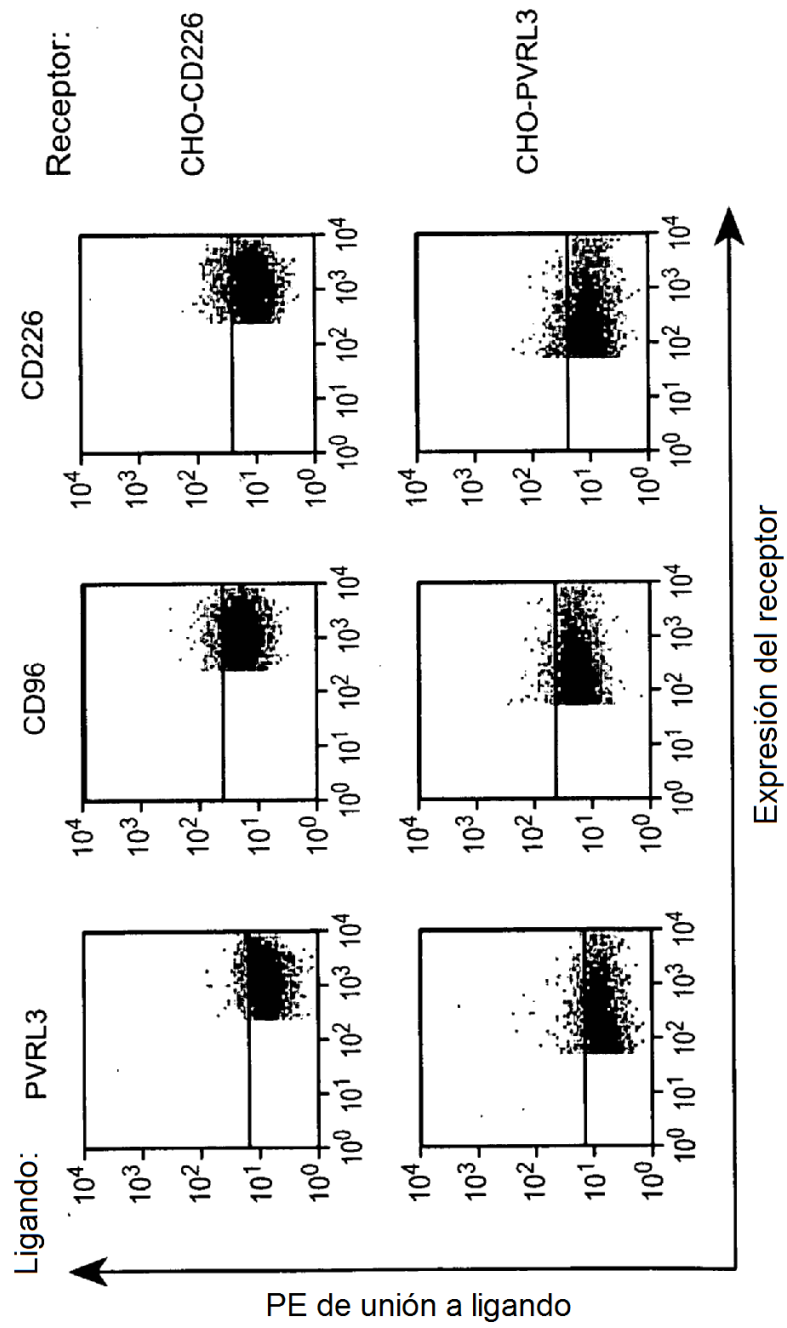


FIG. 4B-6

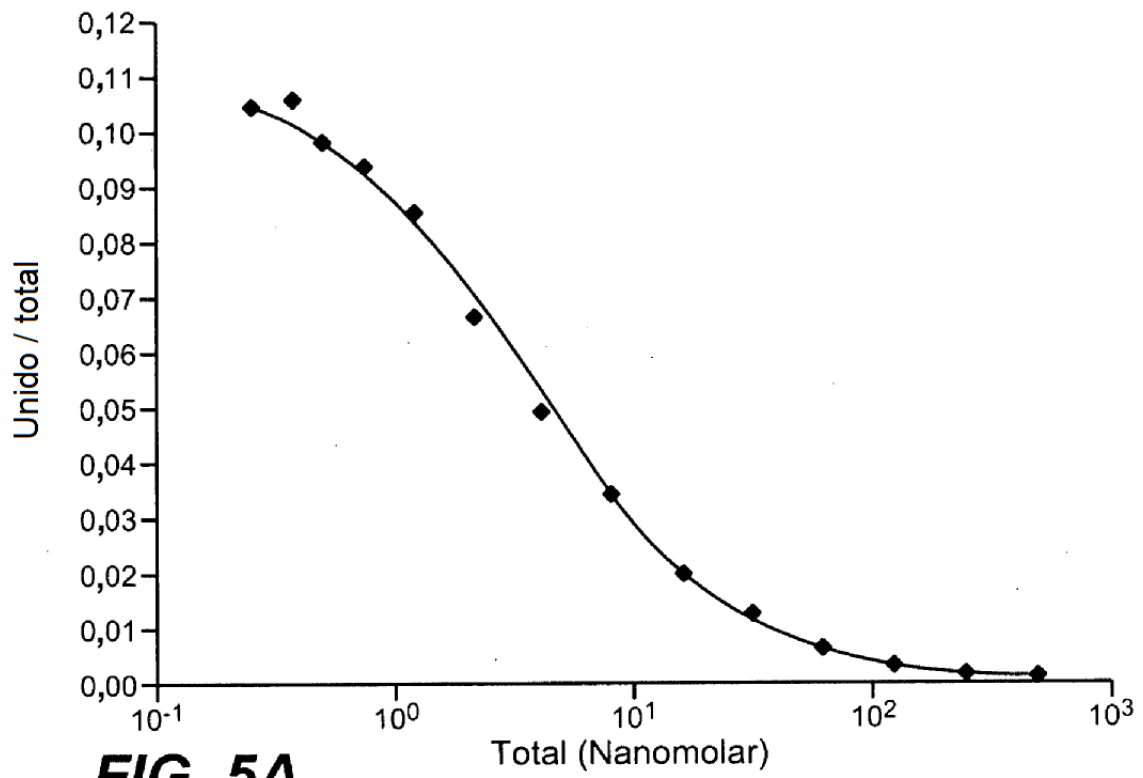


FIG. 5A

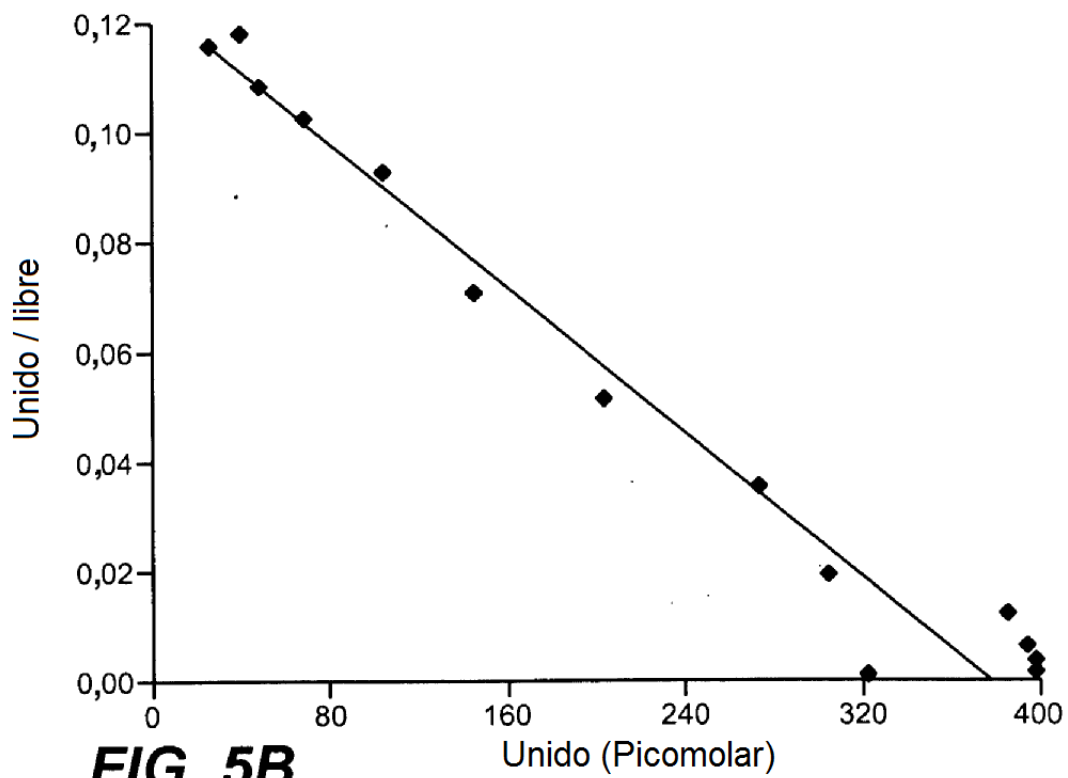


FIG. 5B

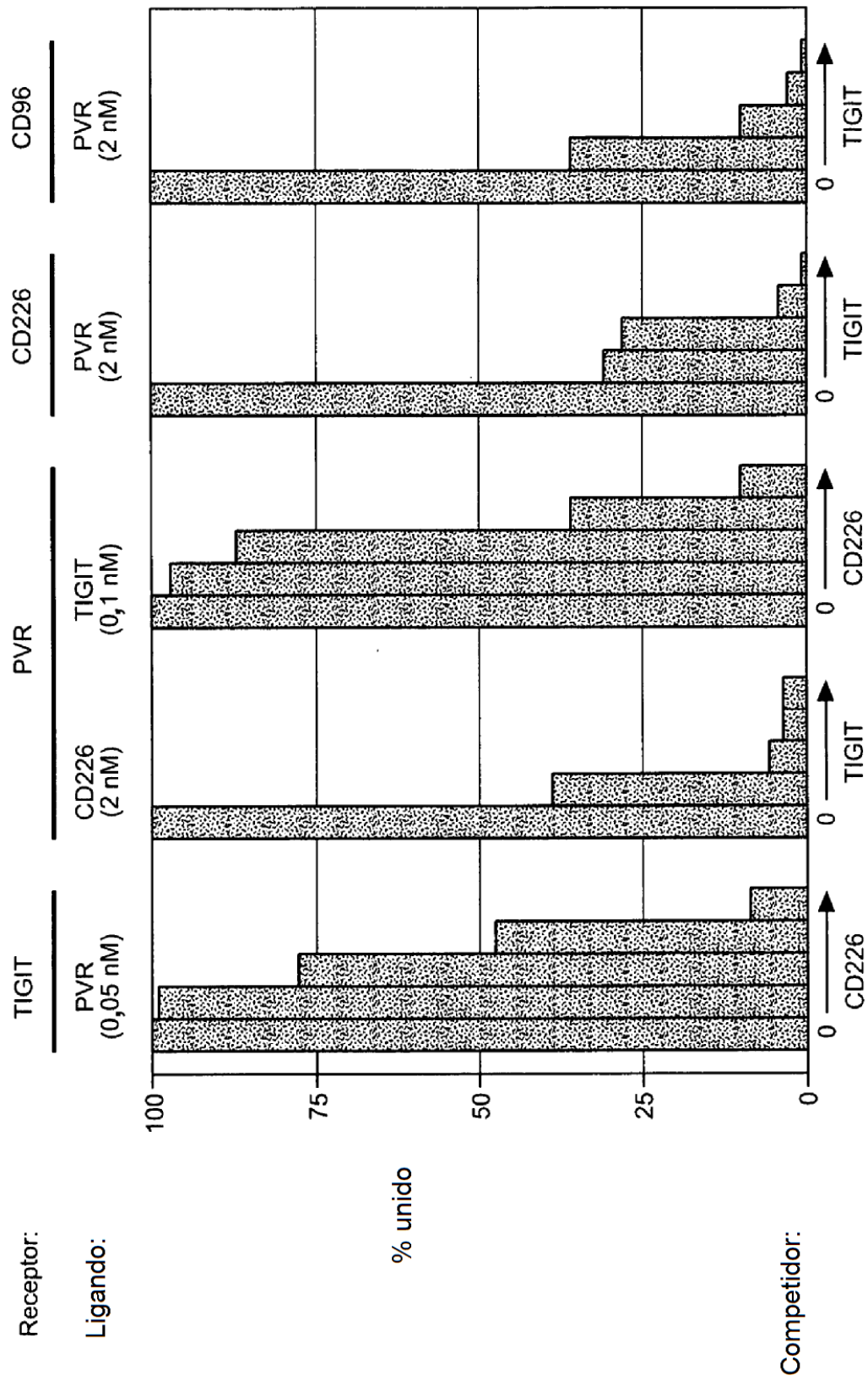


FIG. 6

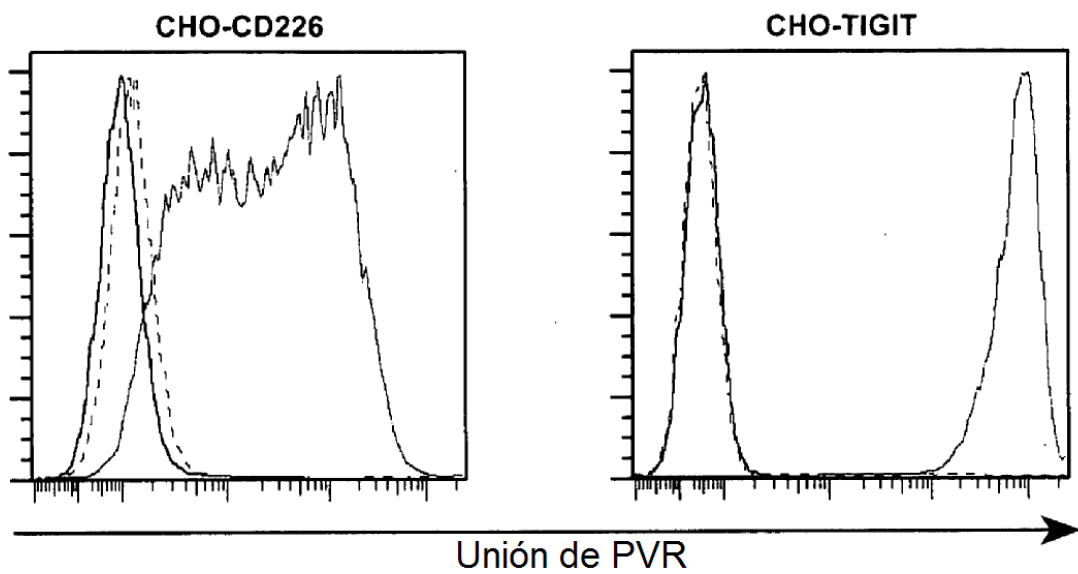


FIG. 7A

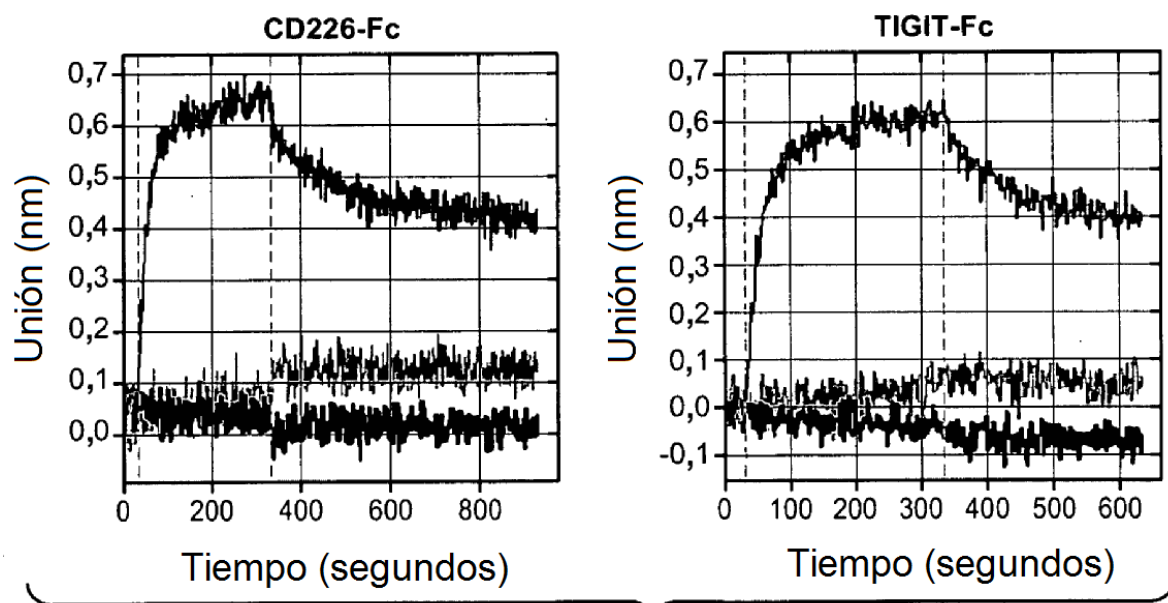


FIG. 7B

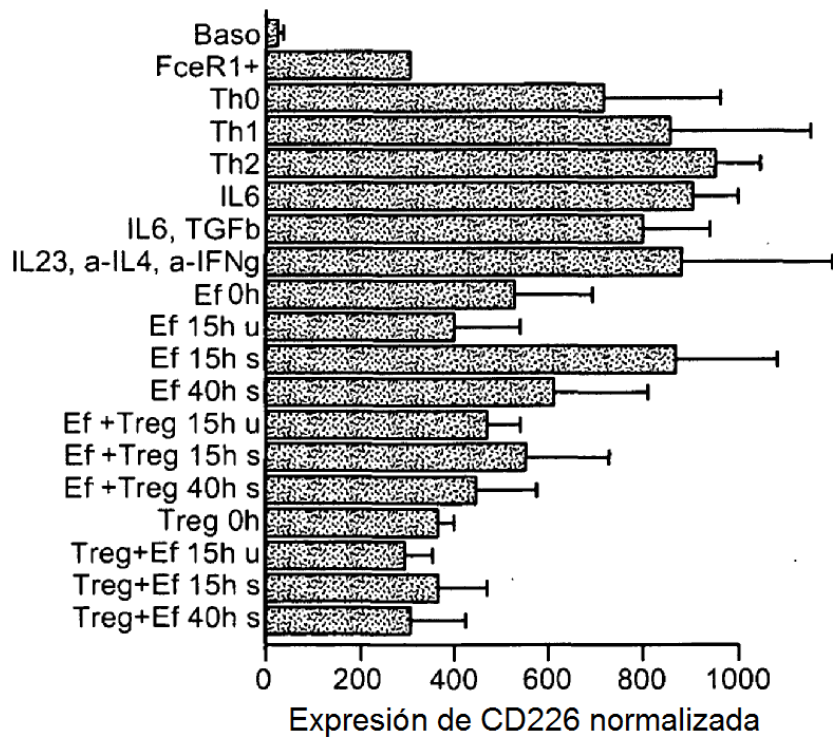
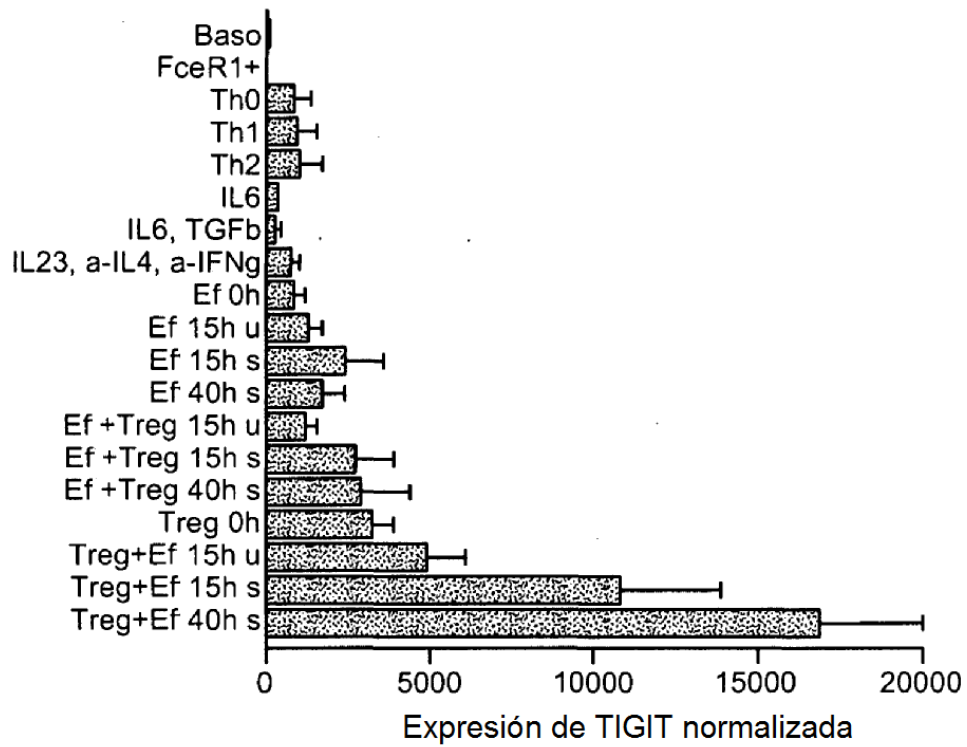
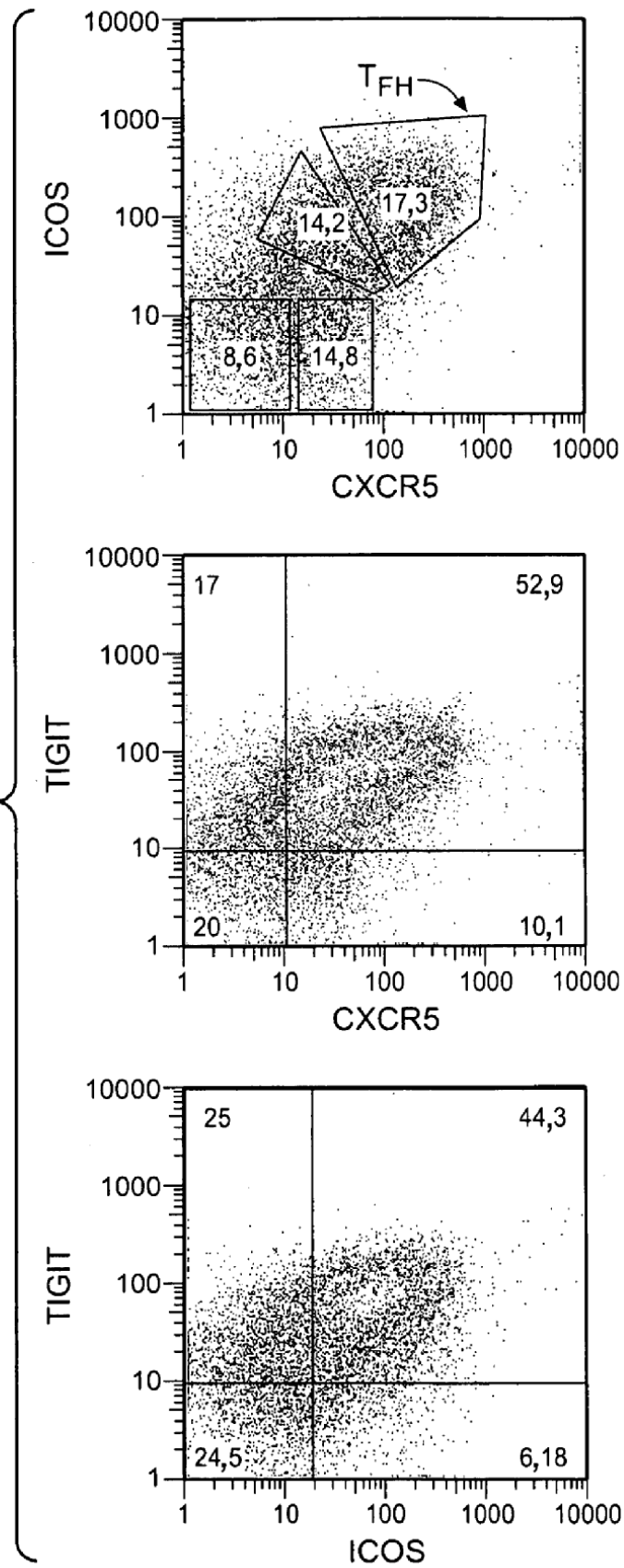


FIG. 8A

FIG. 8B



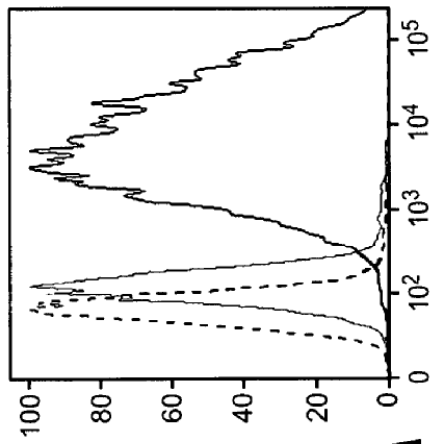


FIG. 9A

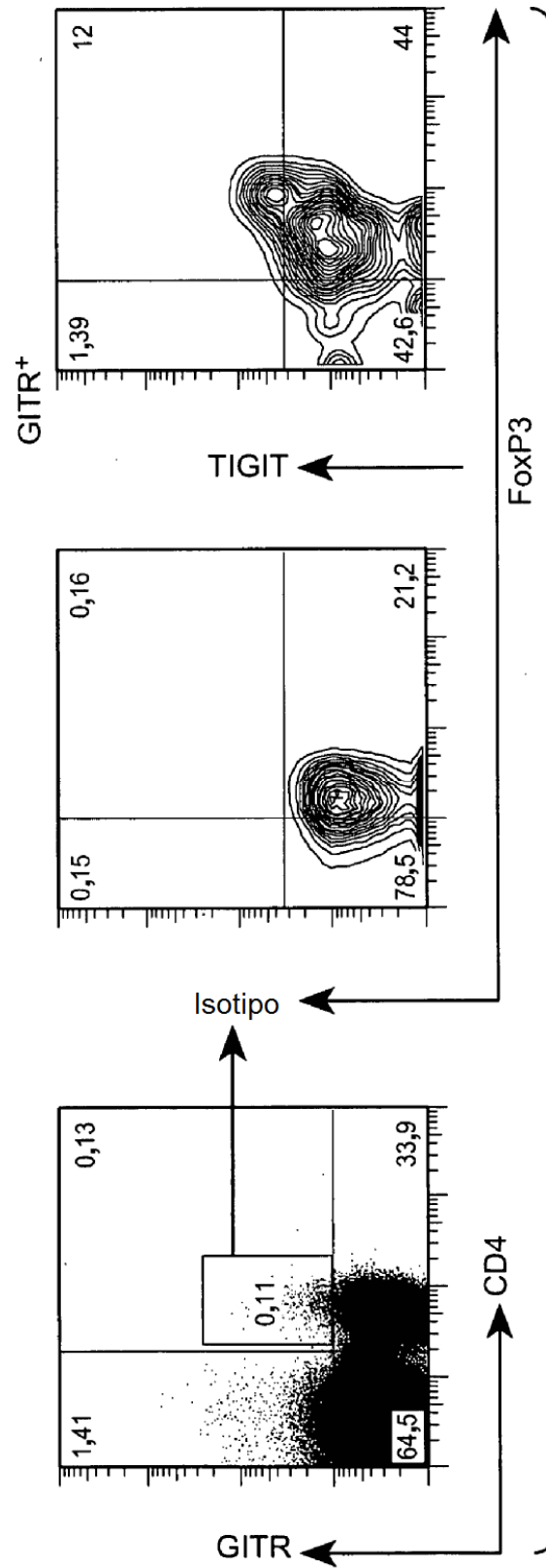


FIG. 9B

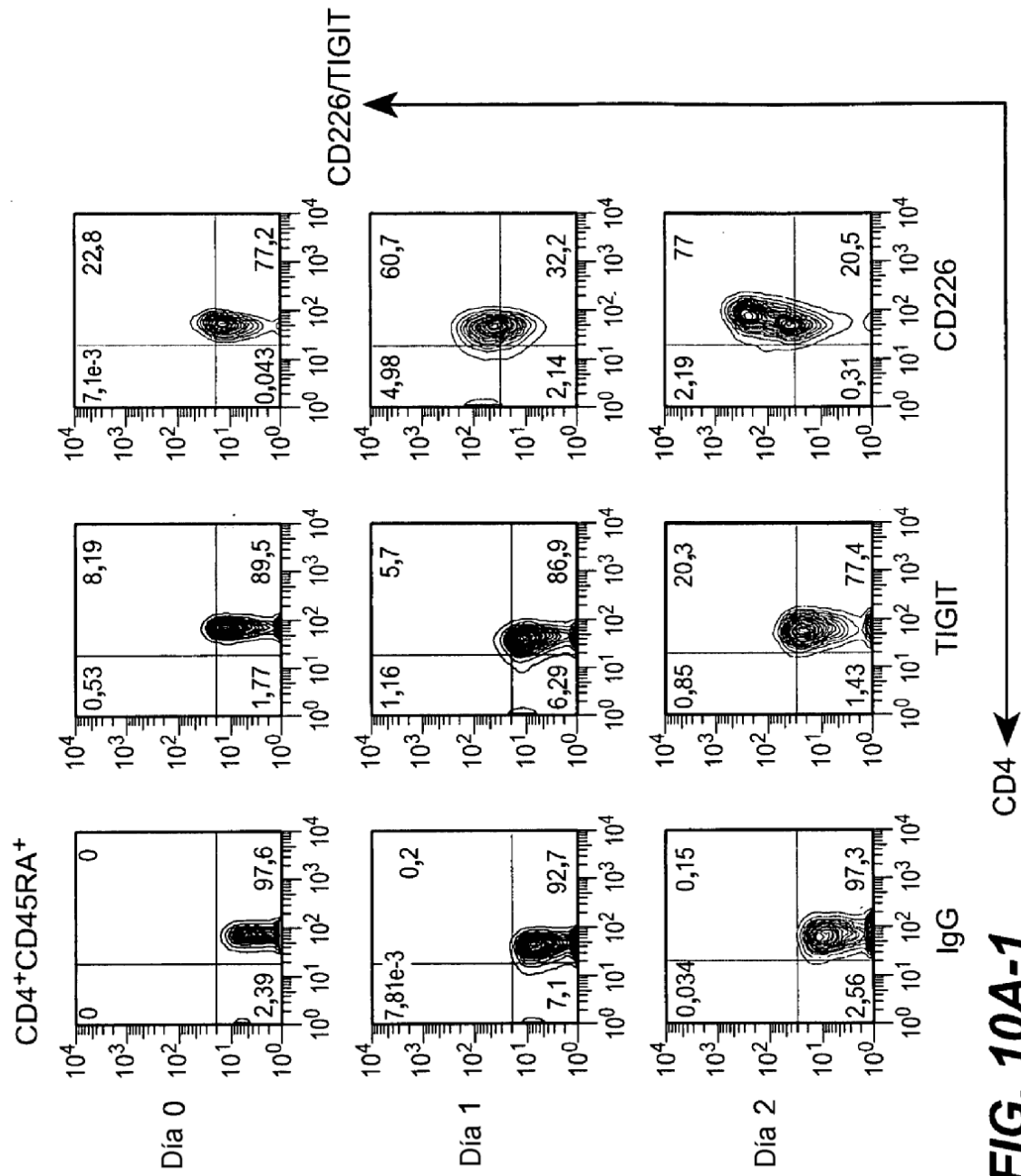


FIG. 10A-1

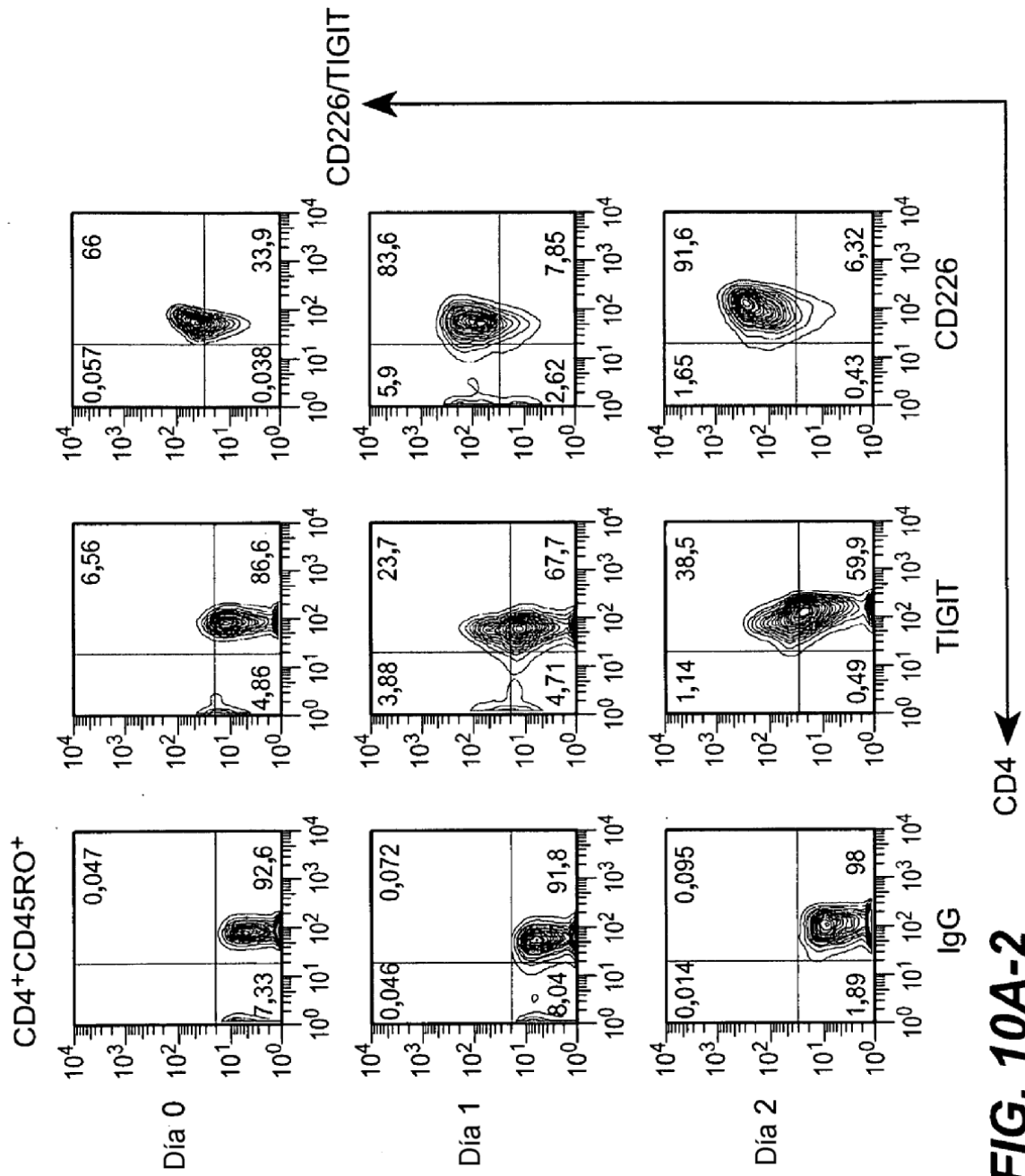
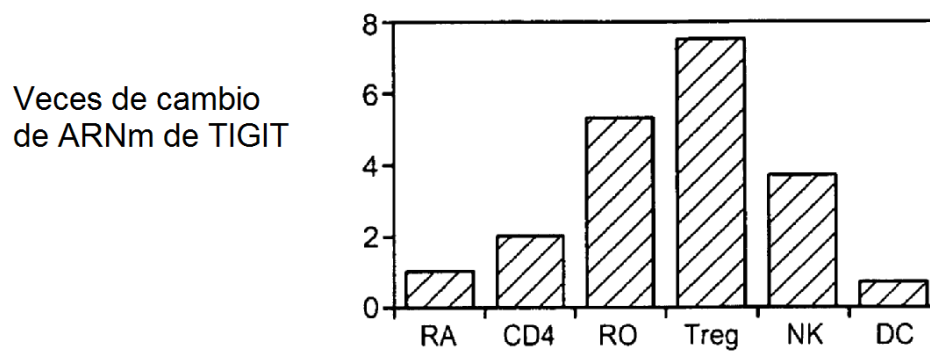
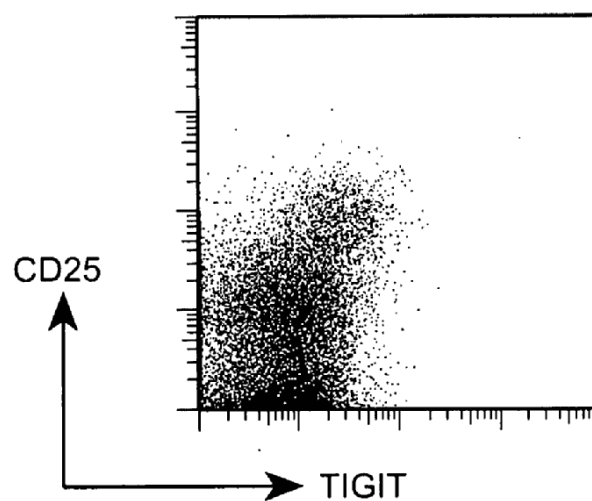


FIG. 10A-2

**FIG. 10B****FIG. 10D**

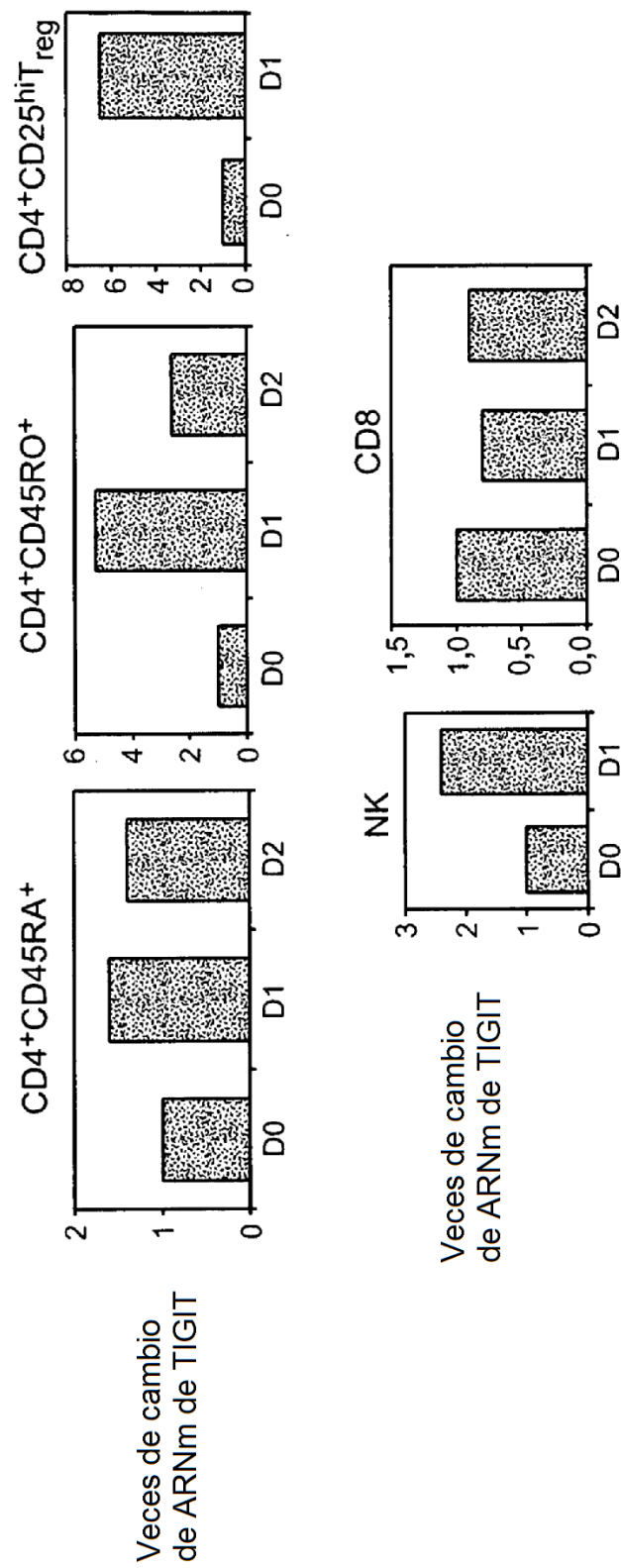


FIG. 10C

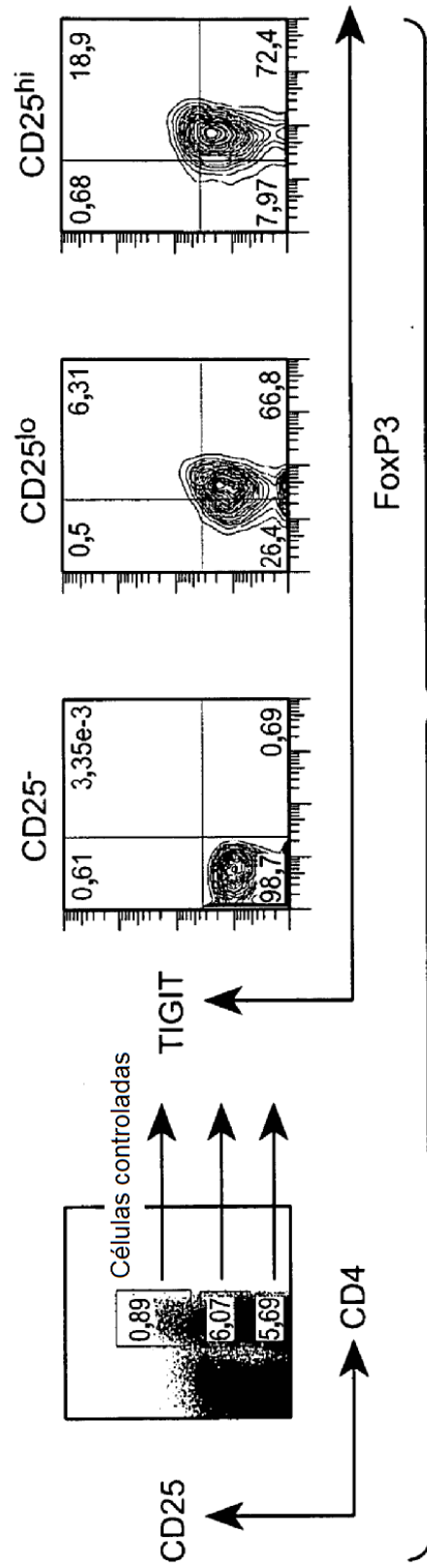


FIG. 10E

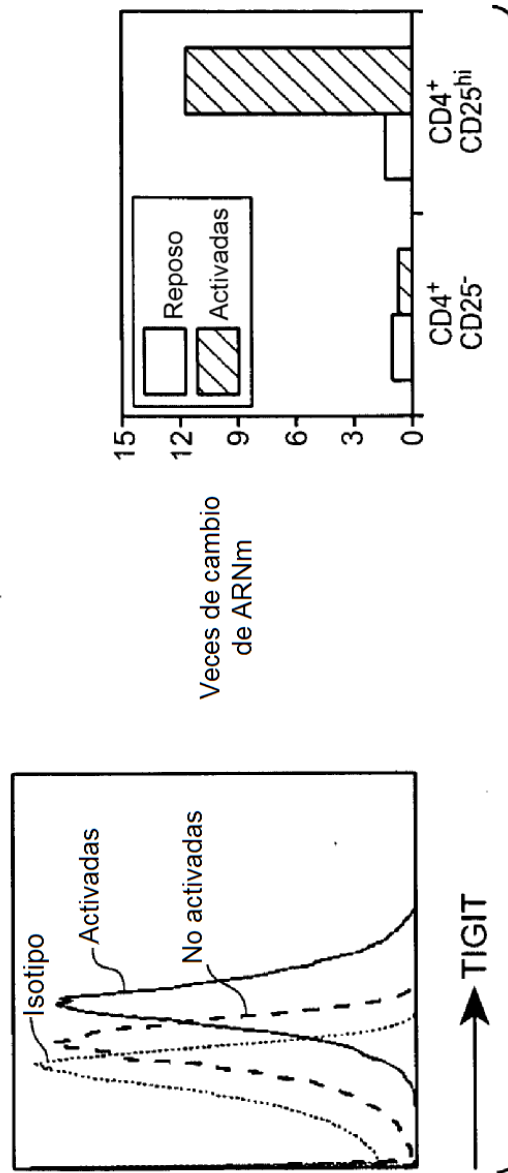


FIG. 10F

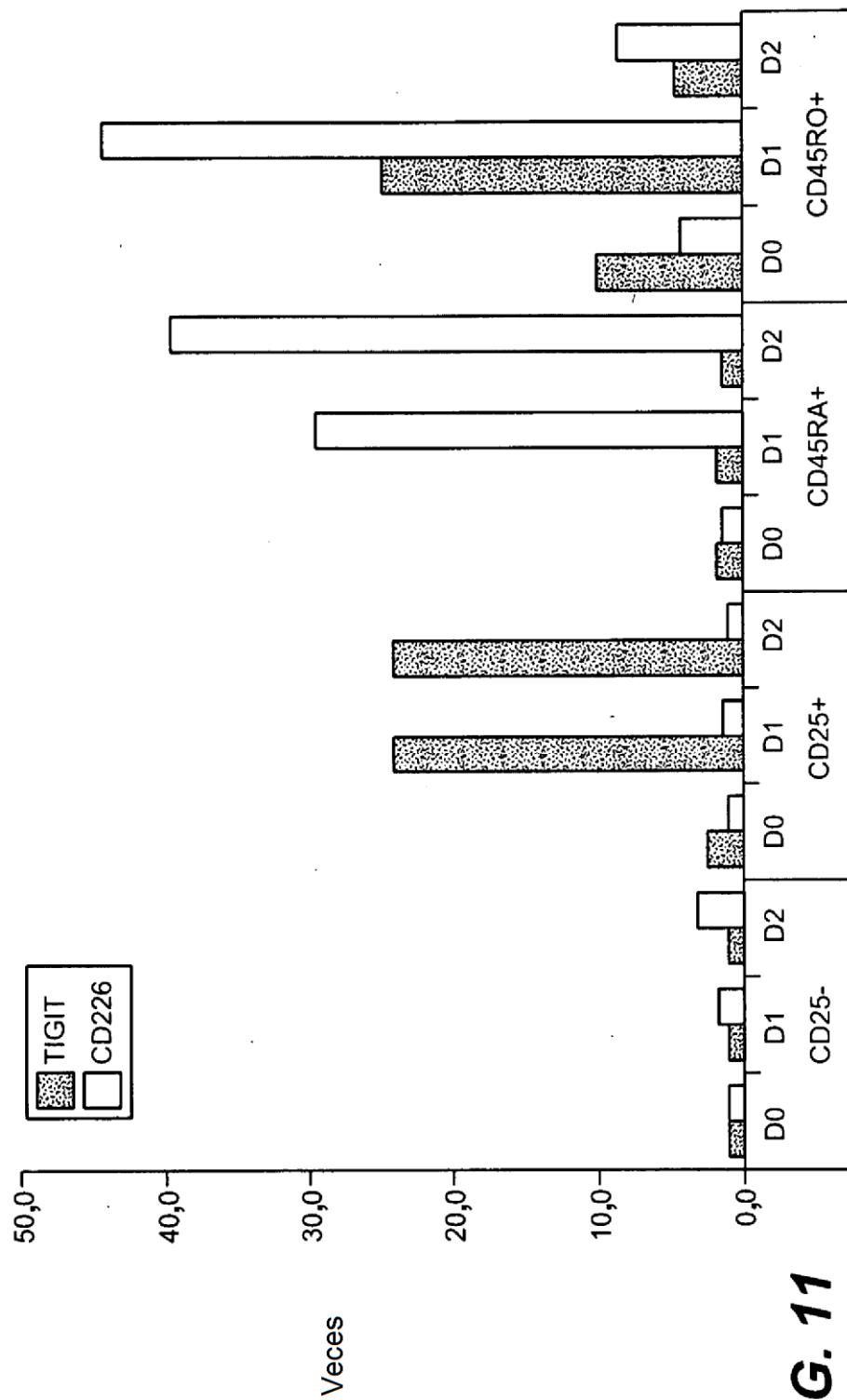


FIG. 11

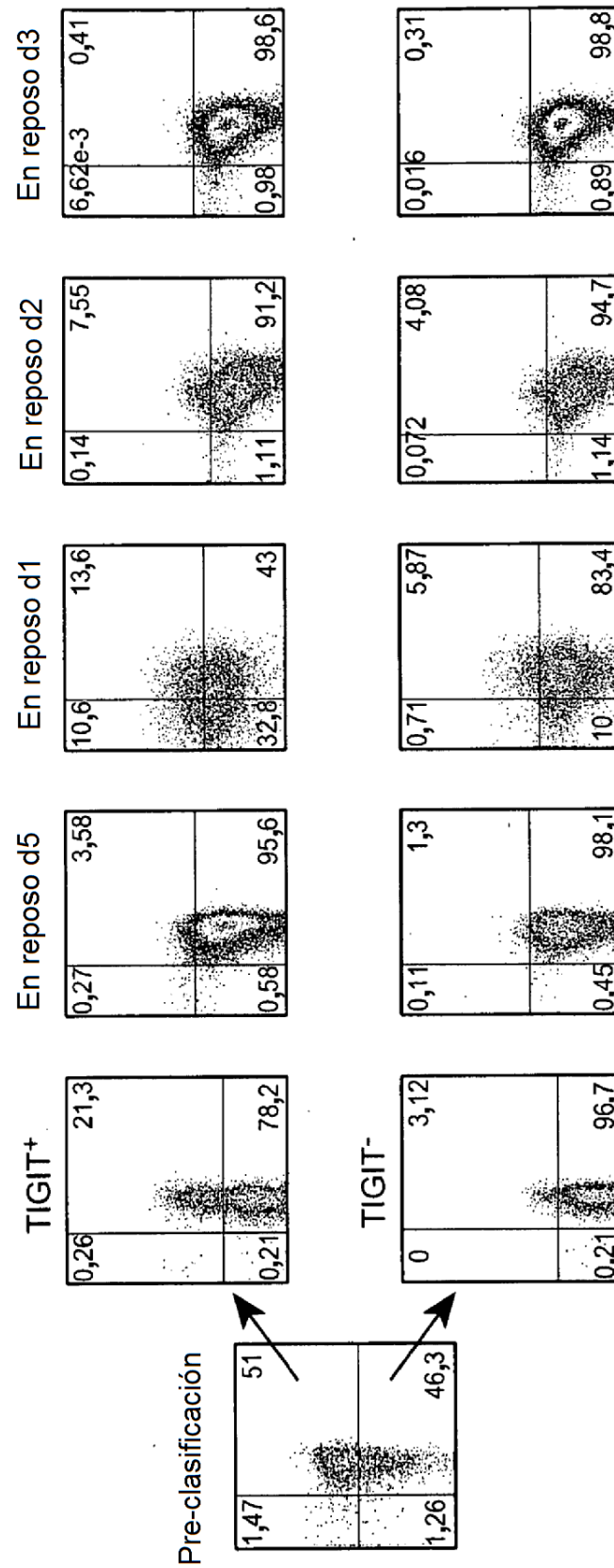


FIG. 12A

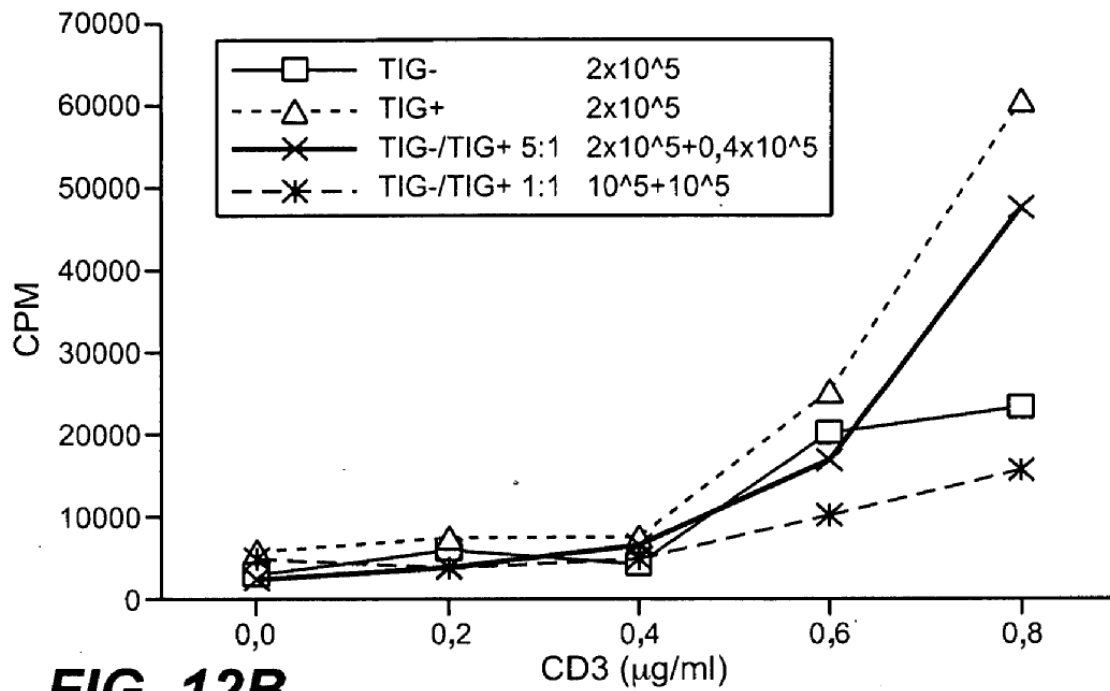


FIG. 12B

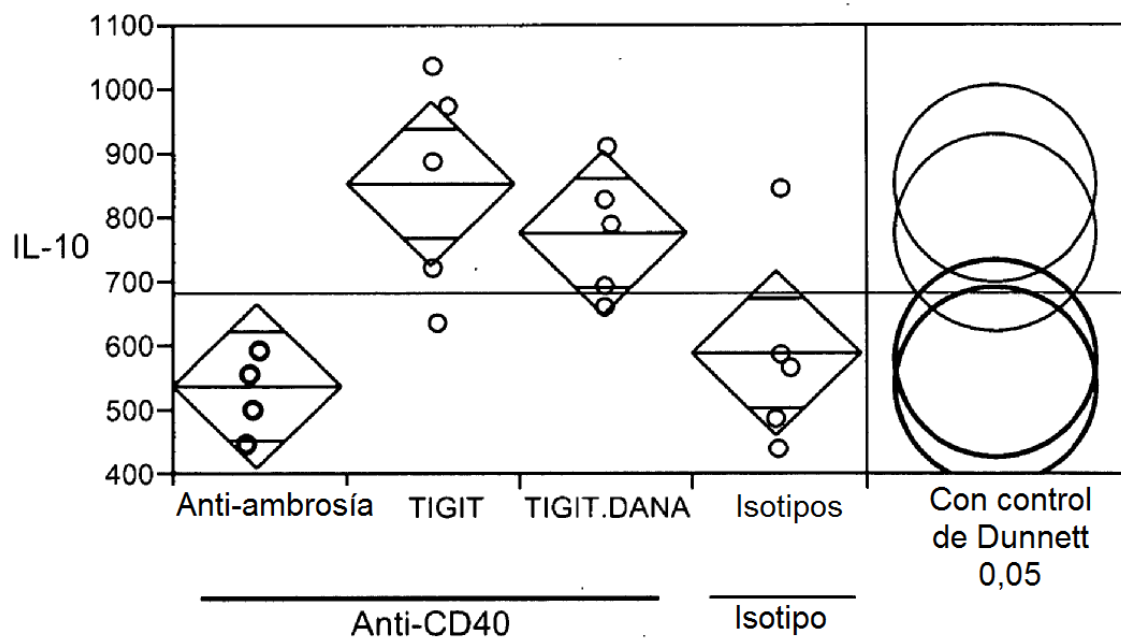


FIG. 13A

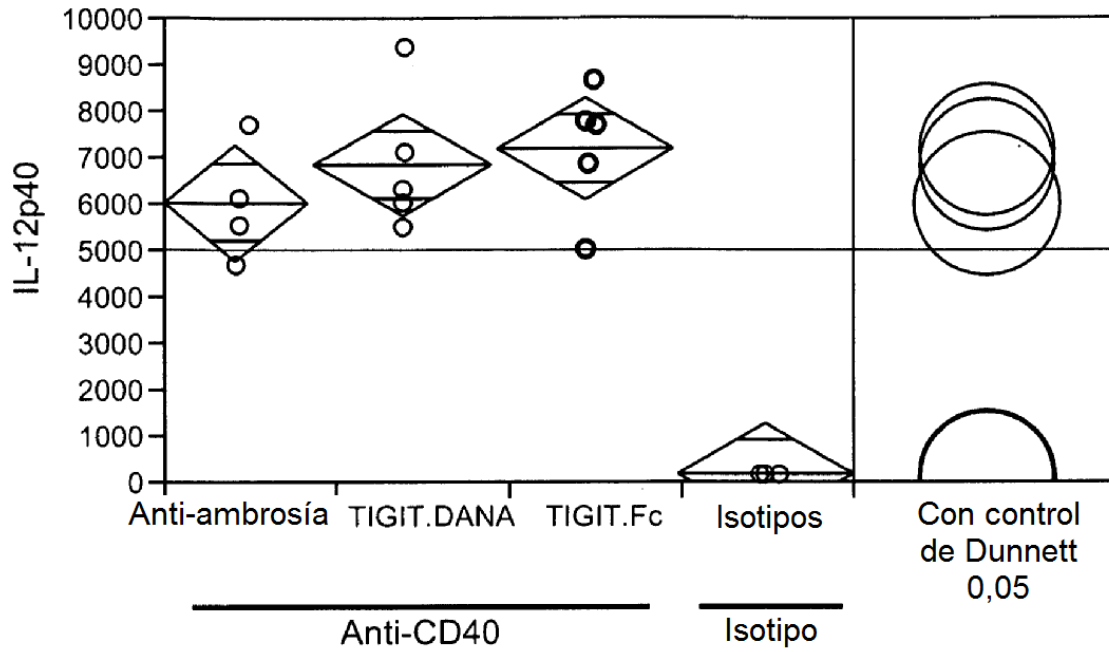


FIG. 13B

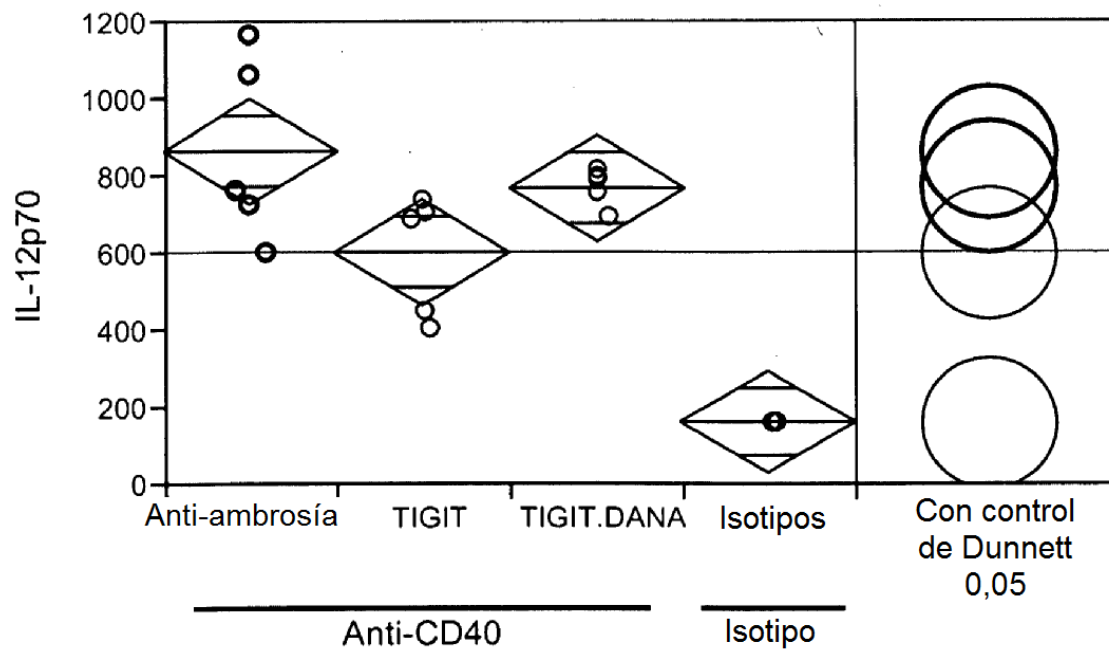
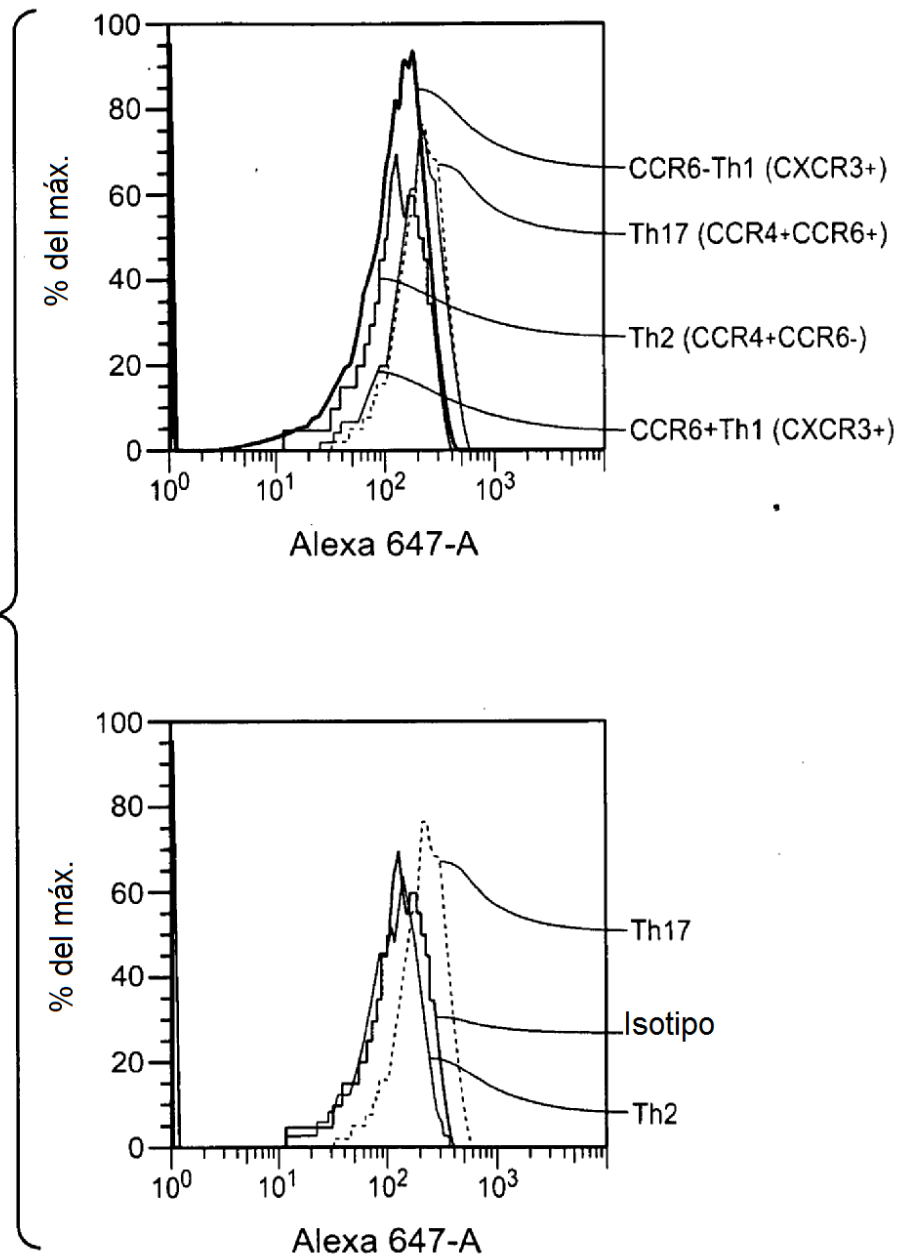


FIG. 13C

FIG. 14



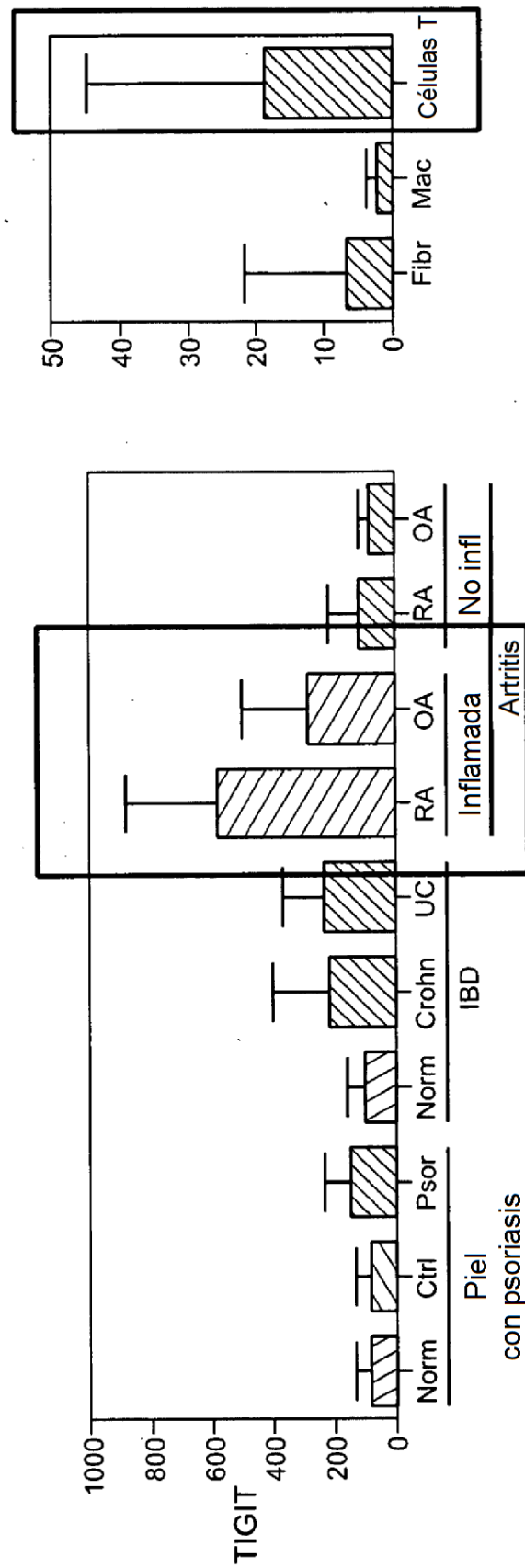


FIG. 15

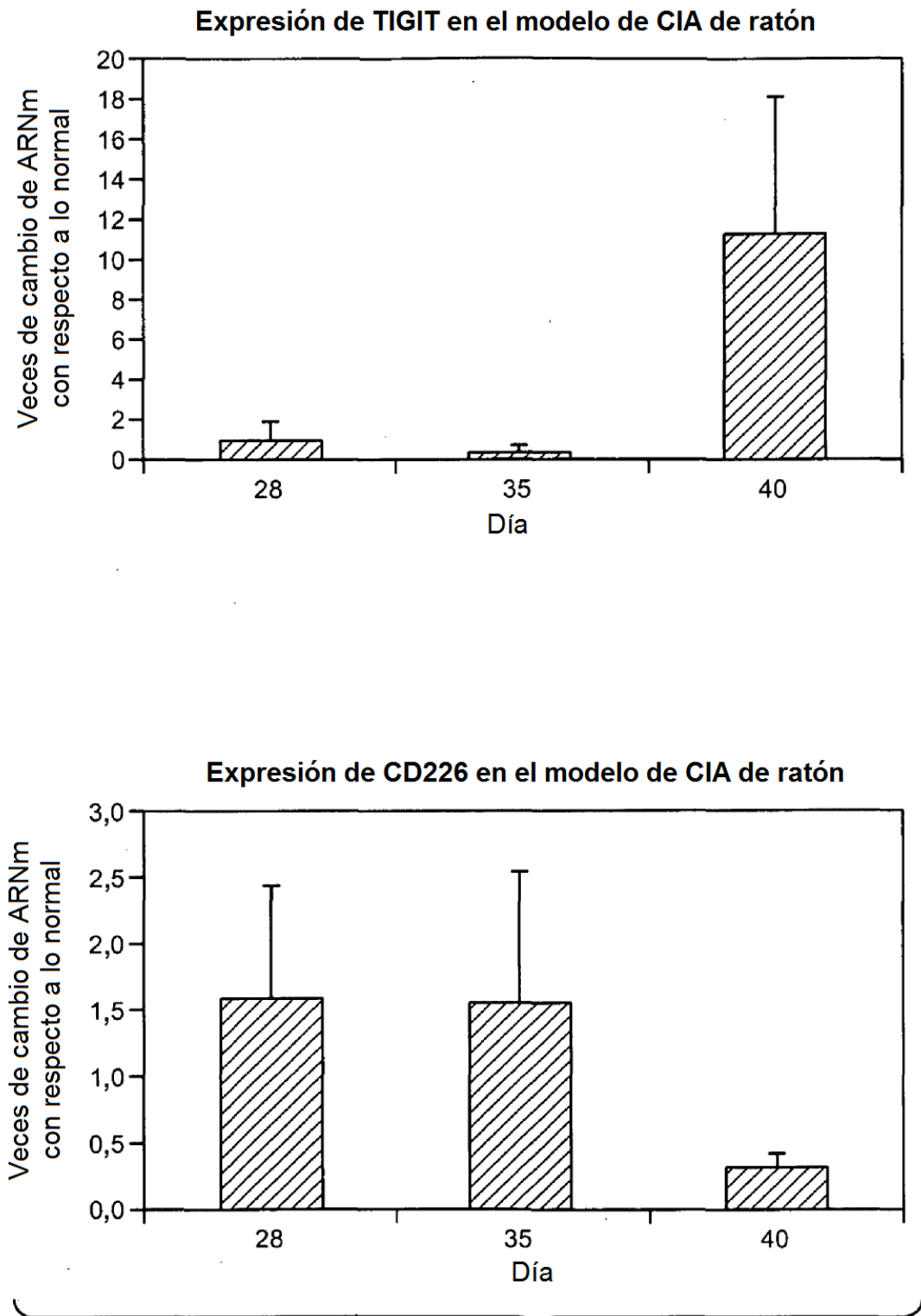


FIG. 16

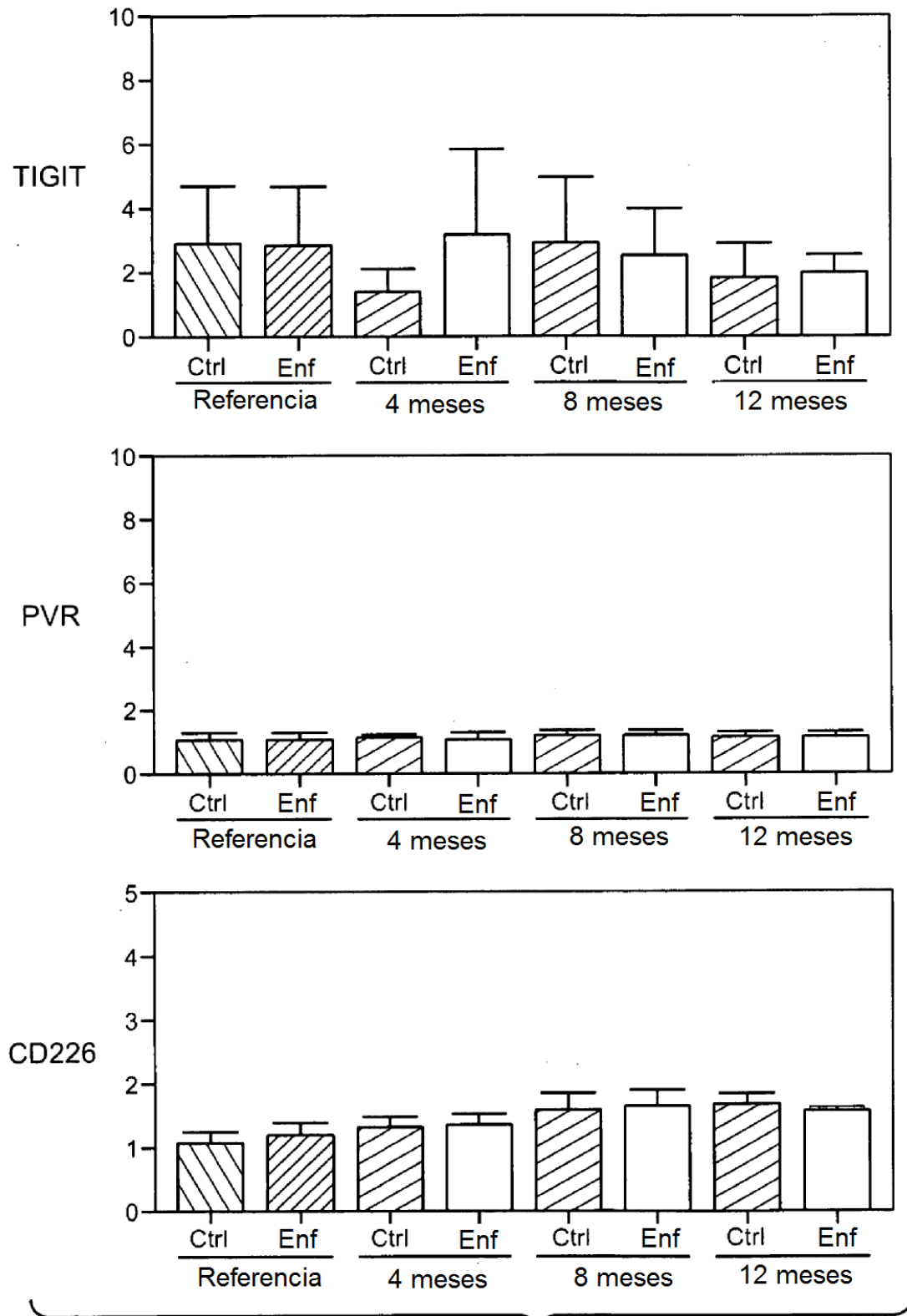


FIG. 17

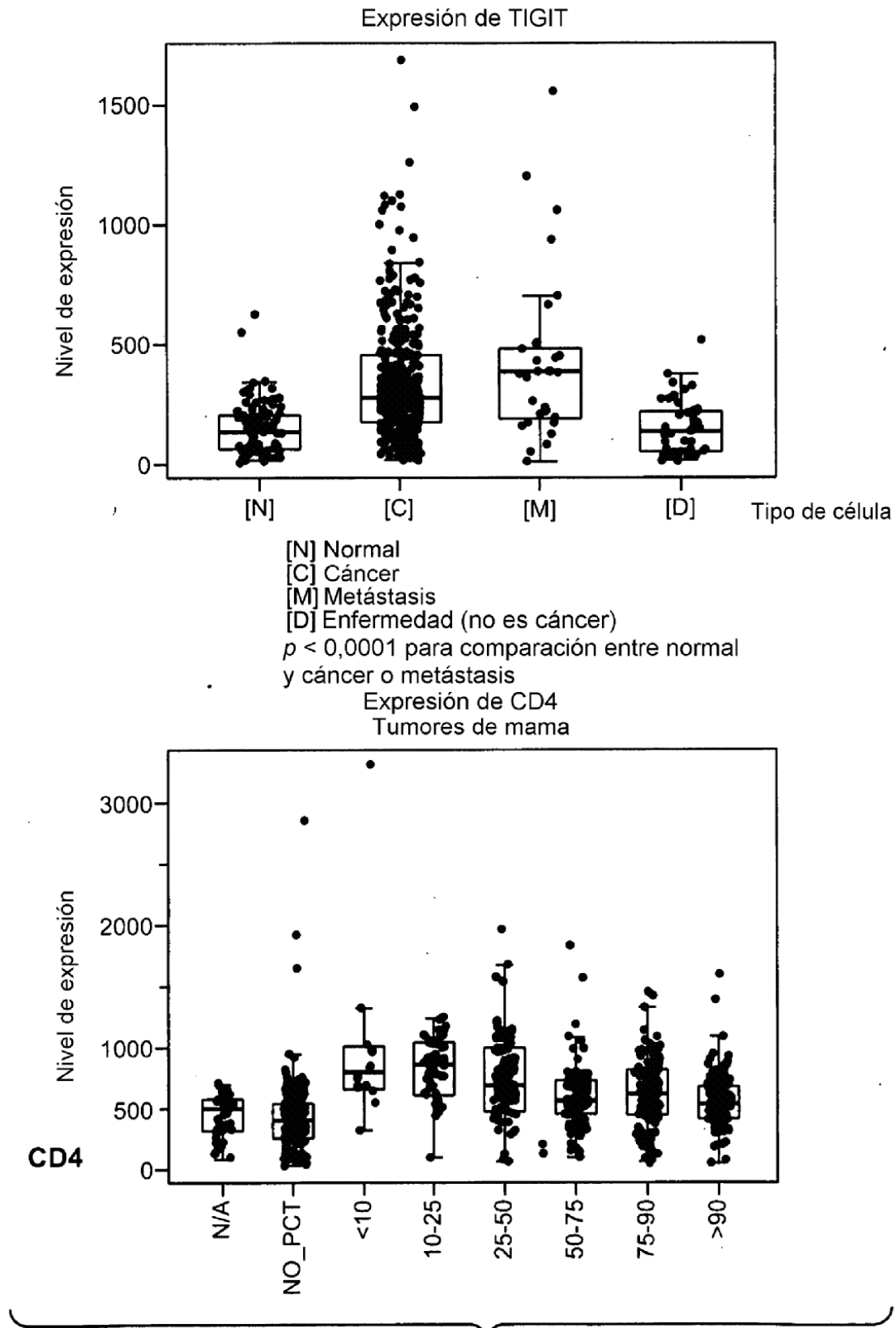


FIG. 18A

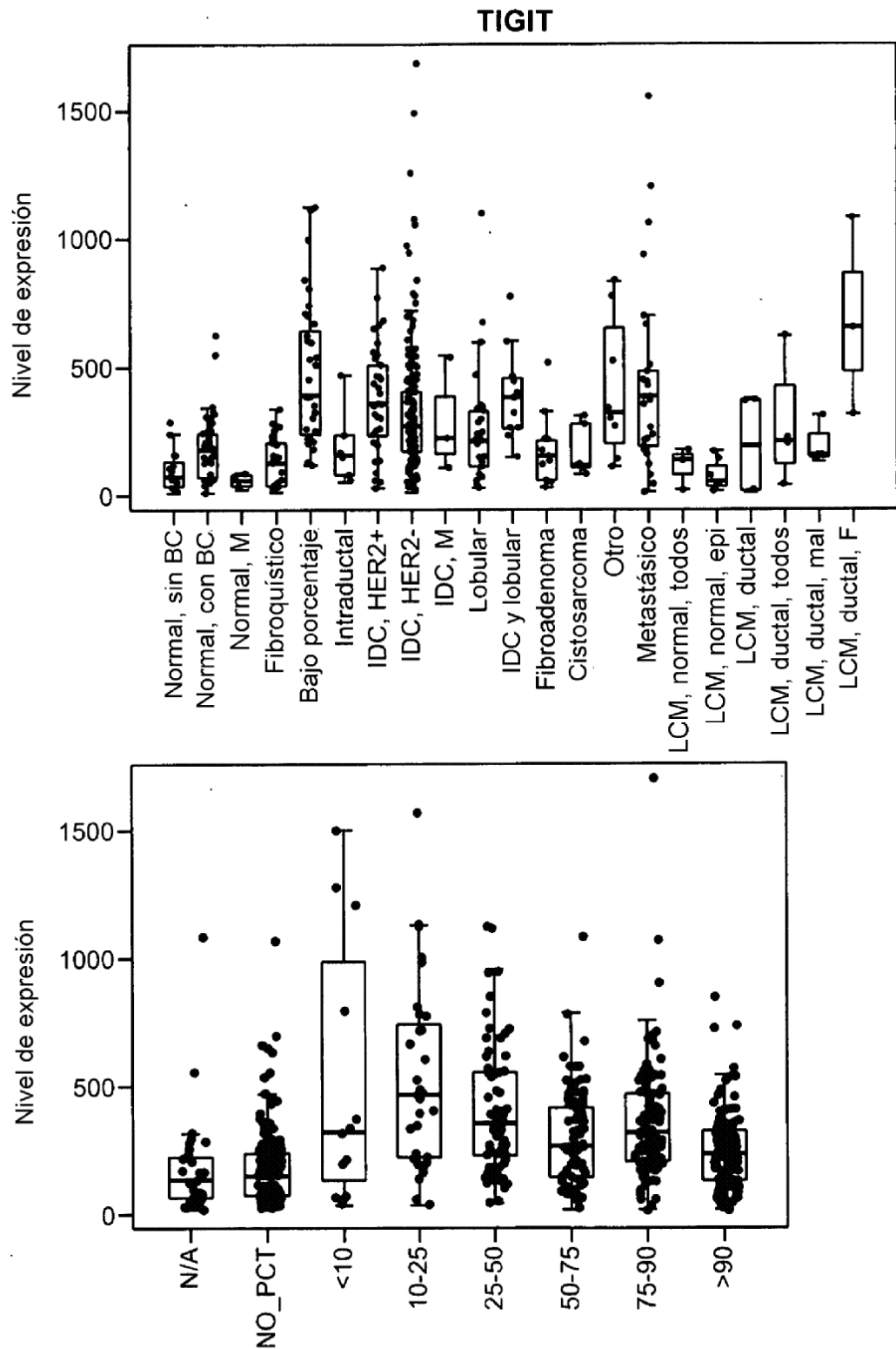


FIG. 18B

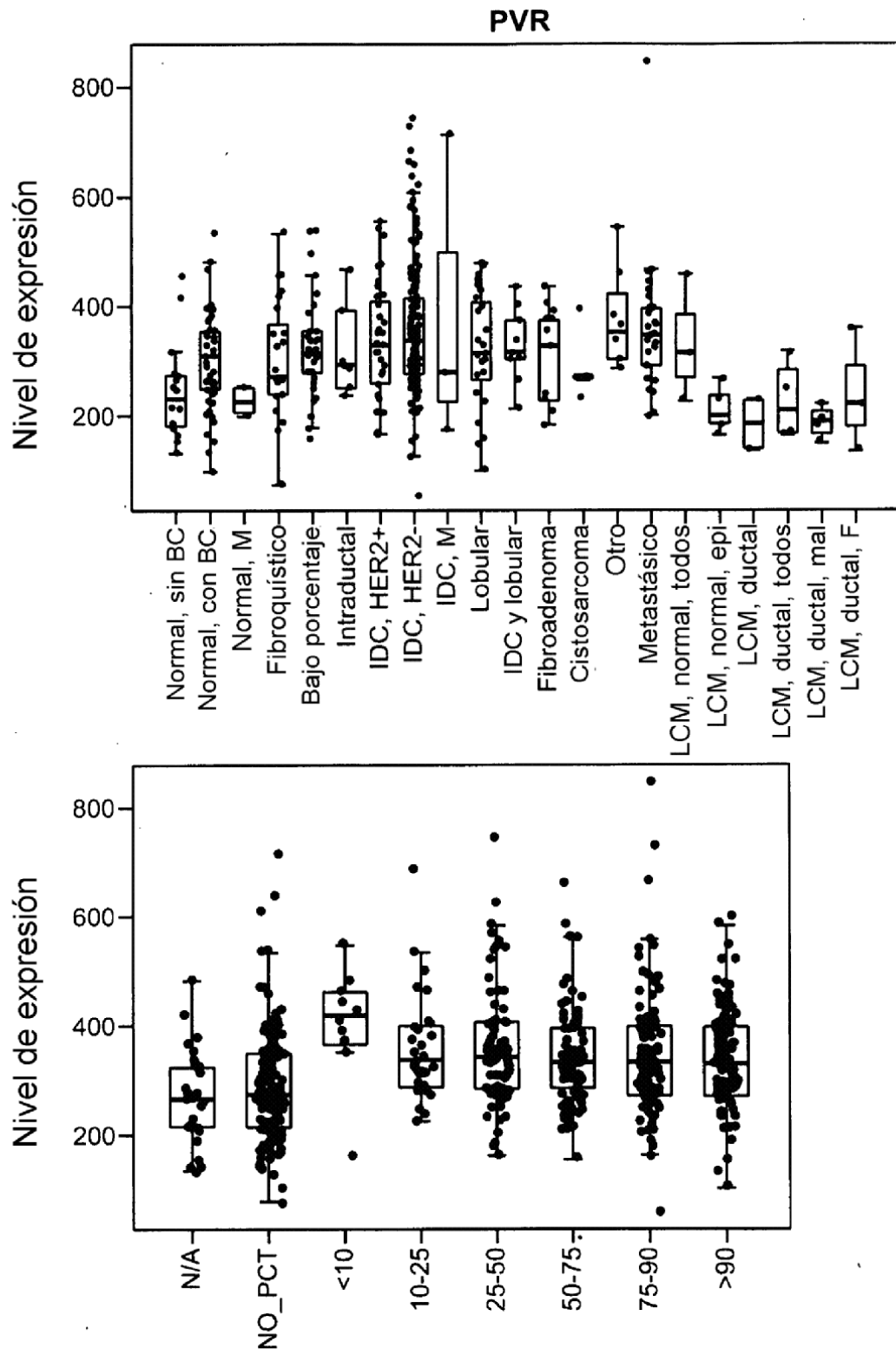


FIG. 18C

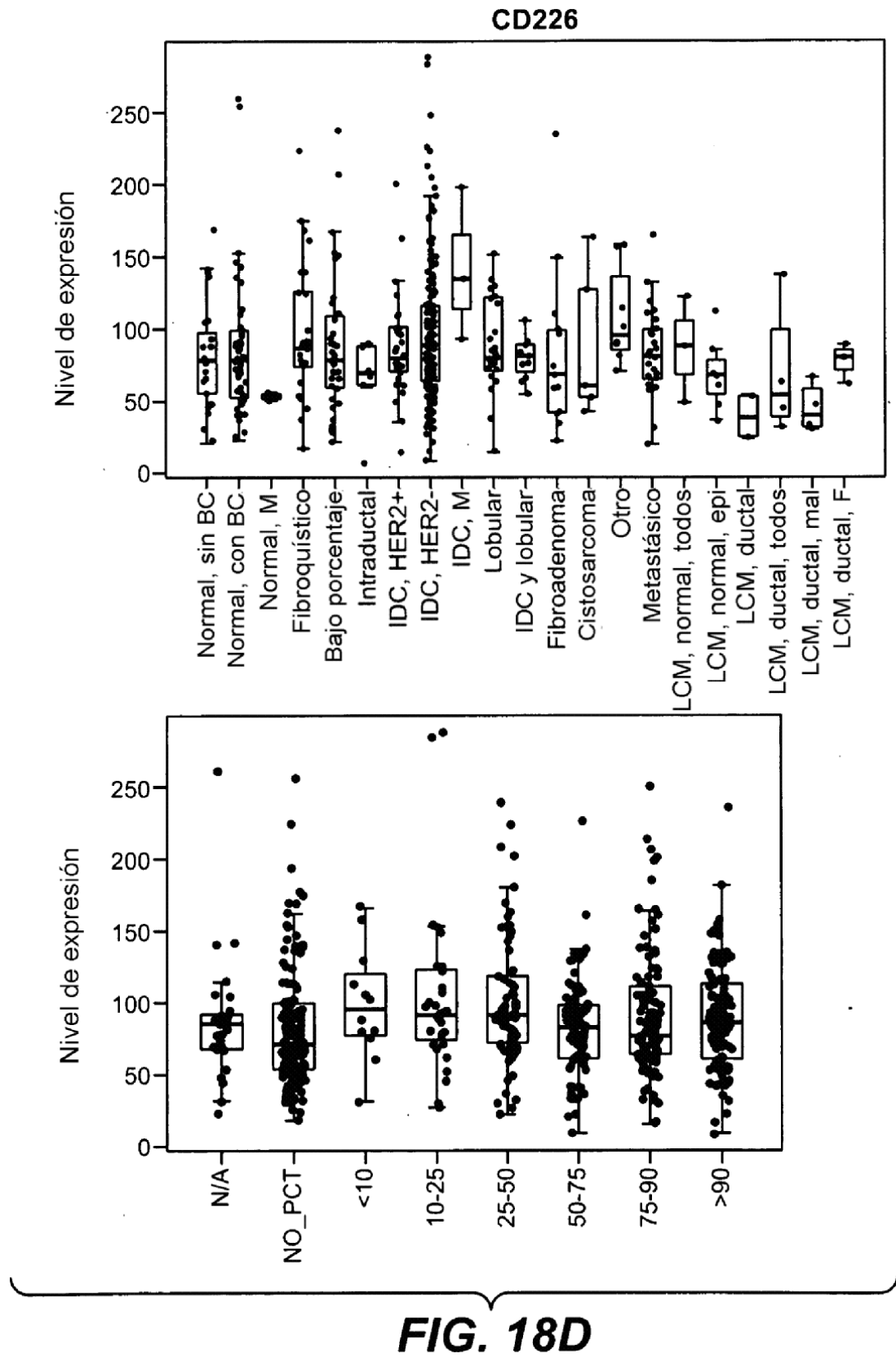
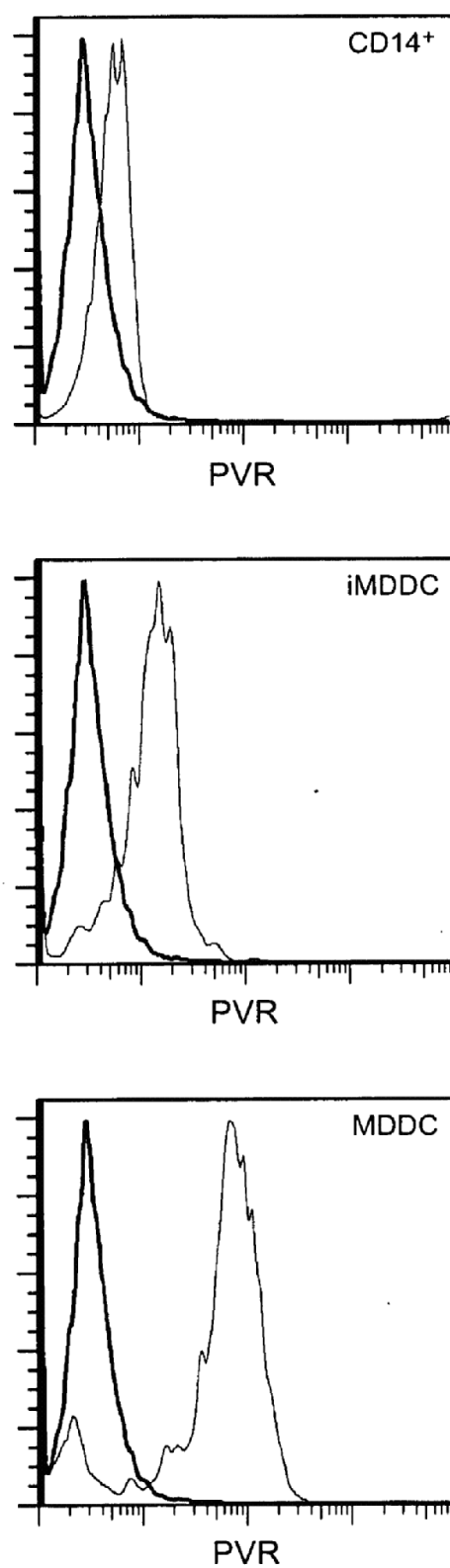


FIG. 19A



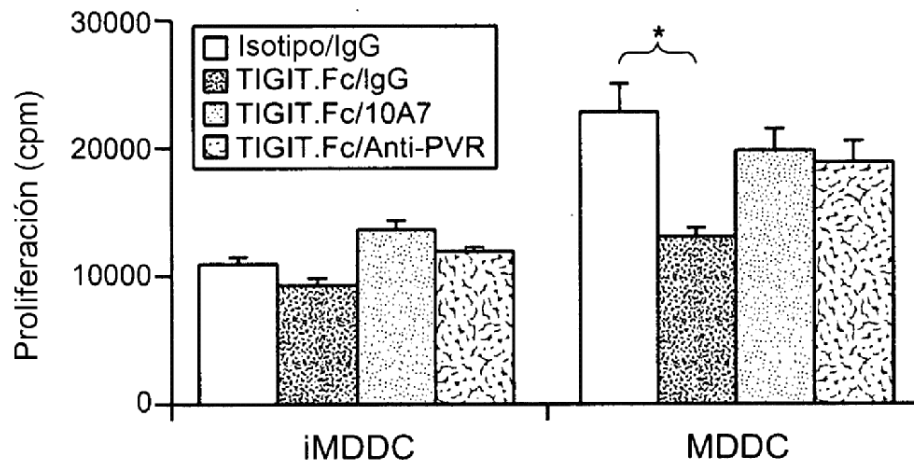


FIG. 19B

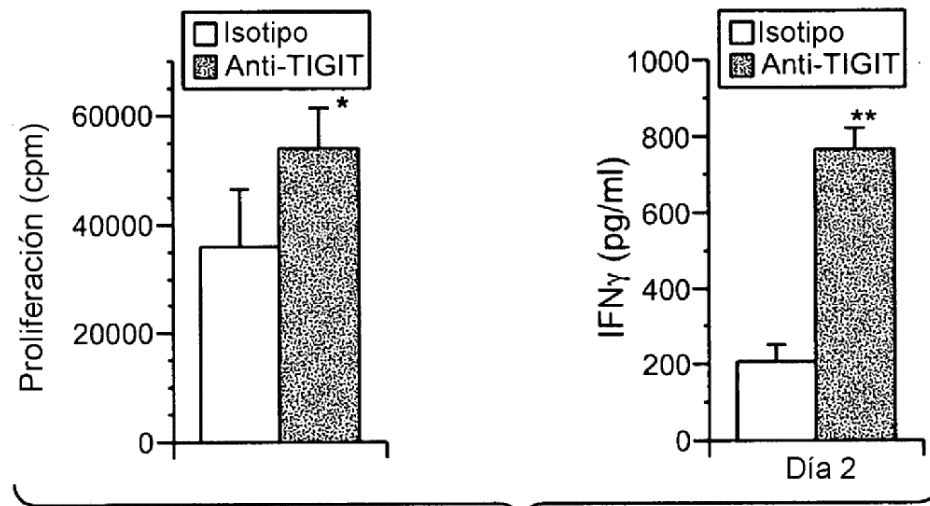


FIG. 19C

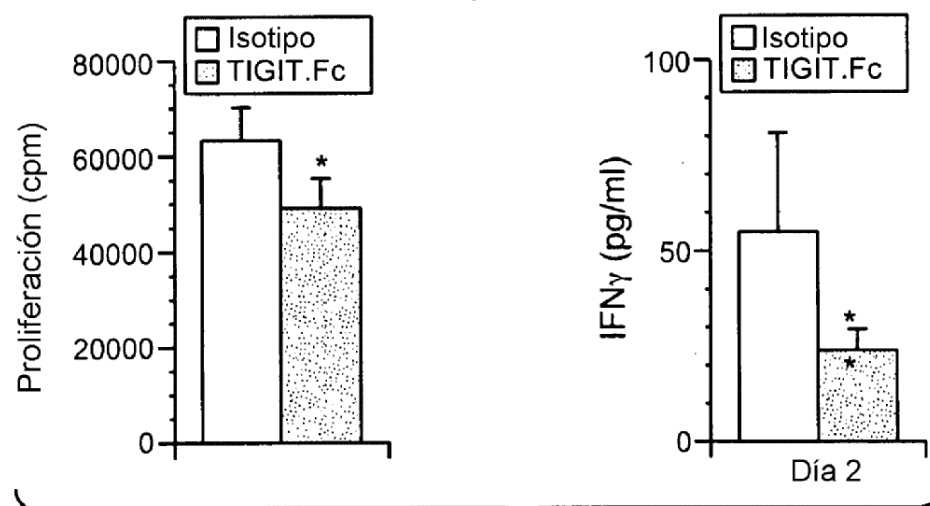
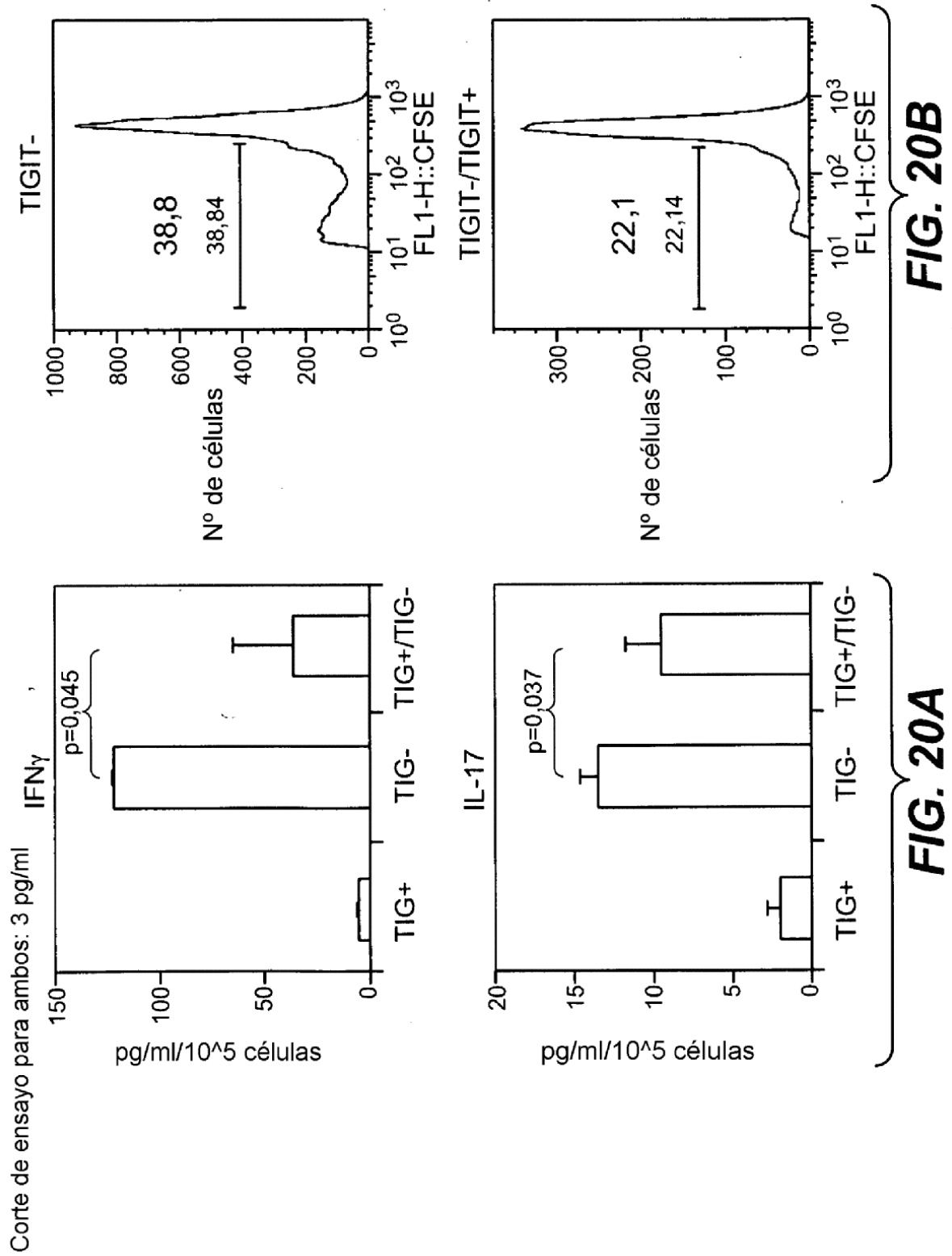


FIG. 19D



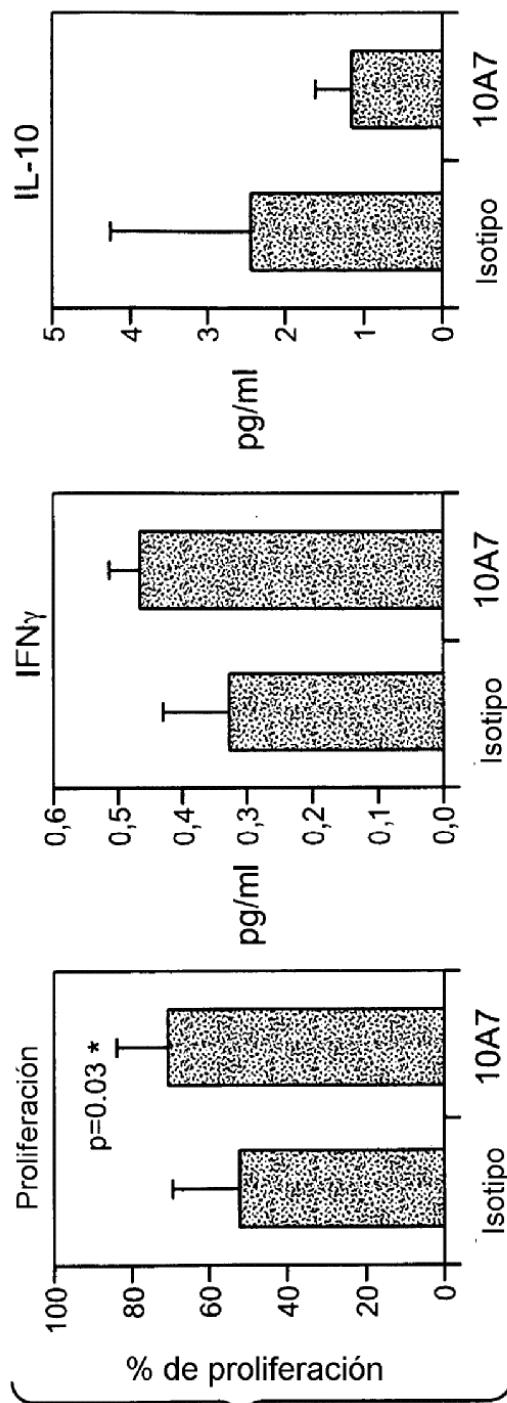


FIG. 21A

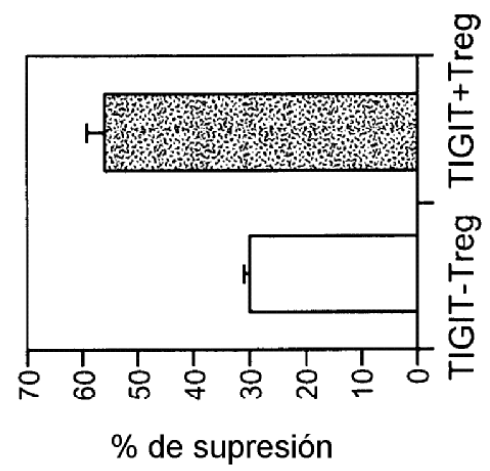


FIG. 21B

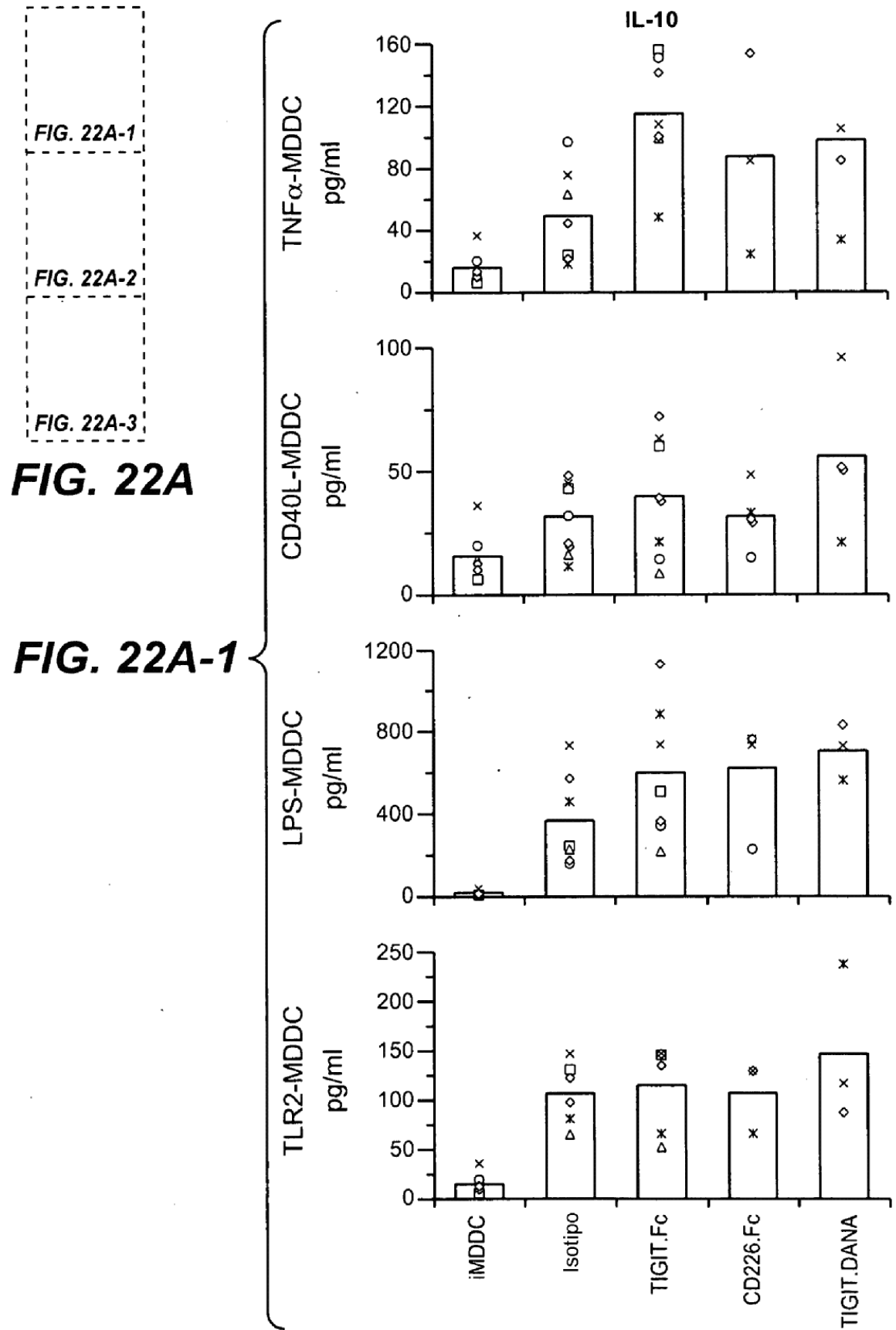


FIG. 22A-2

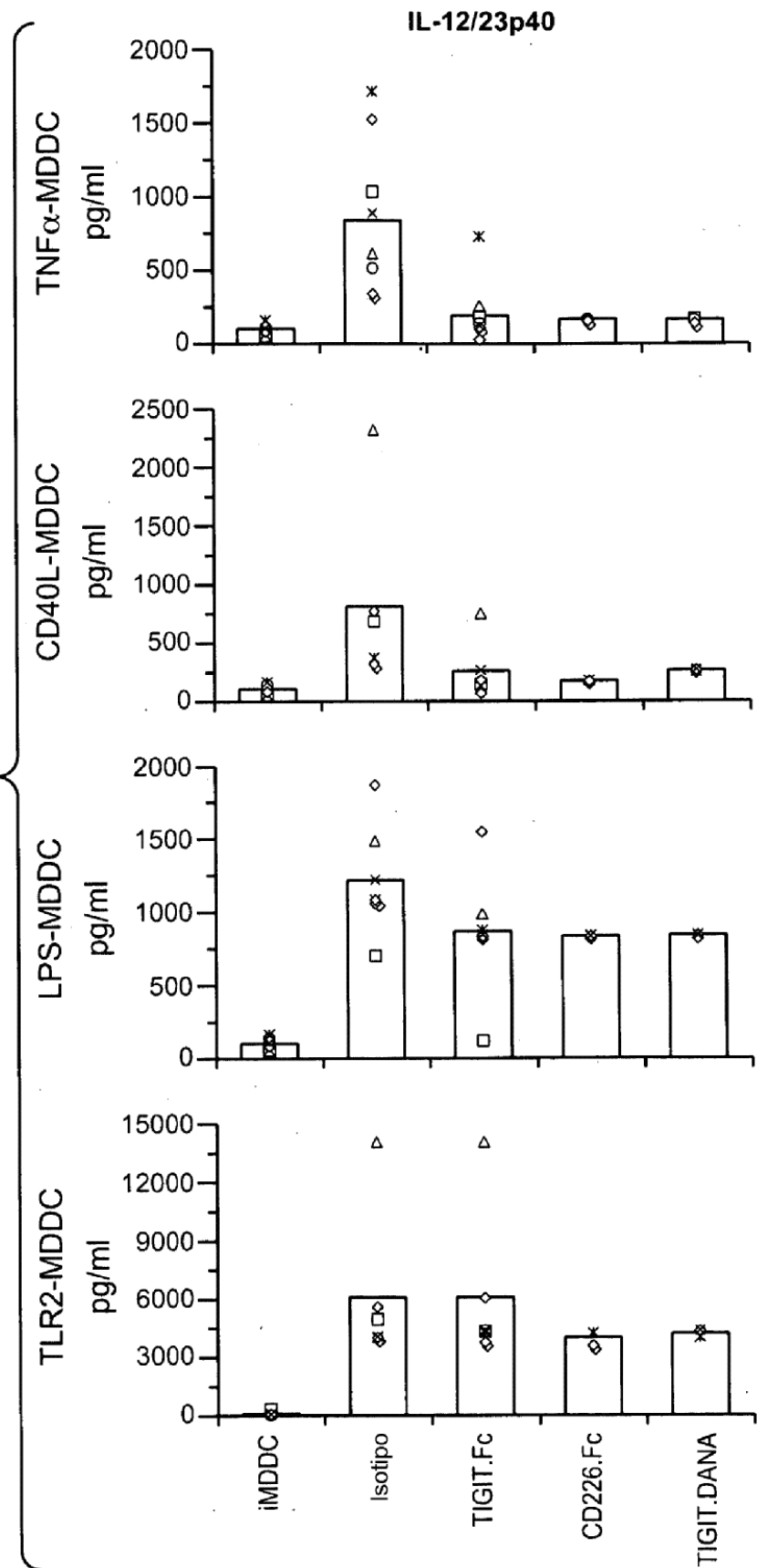
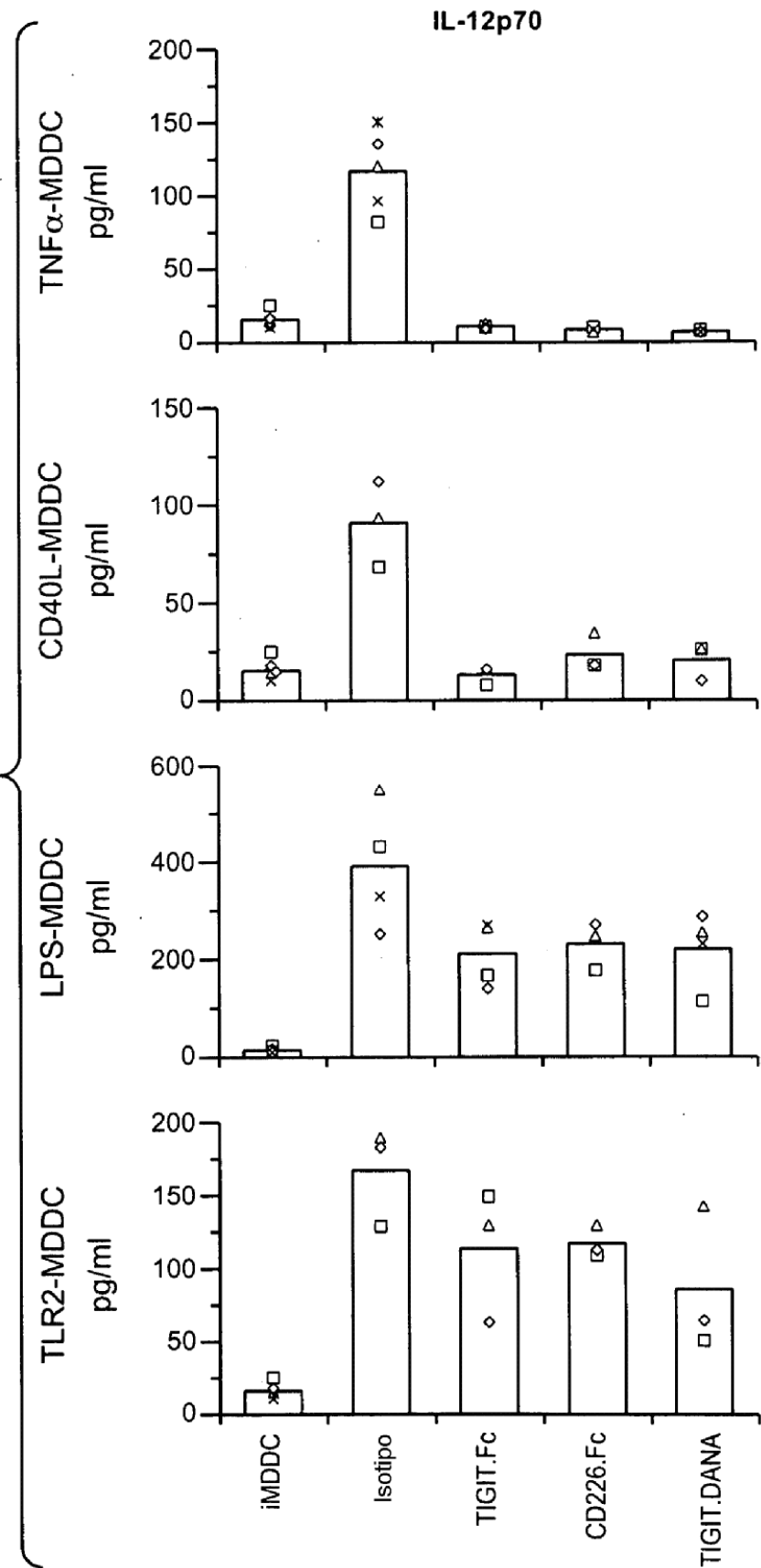


FIG. 22A-3

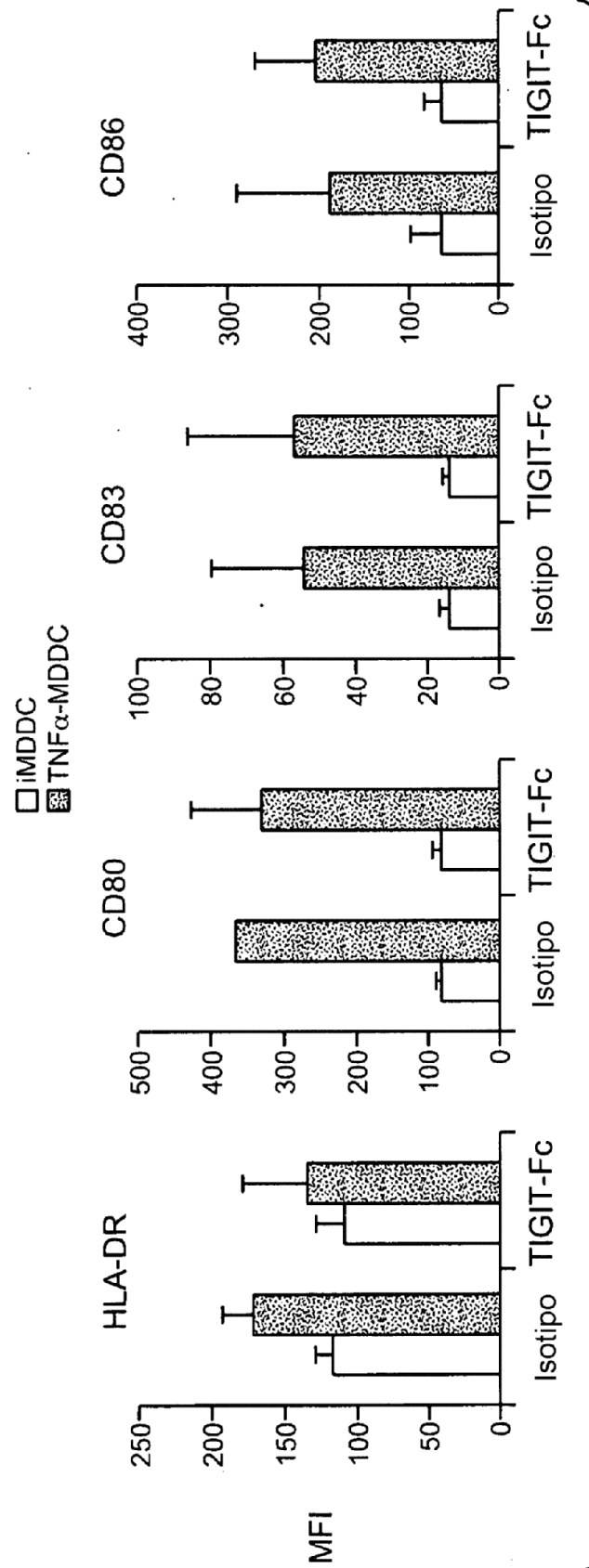


FIG. 22B

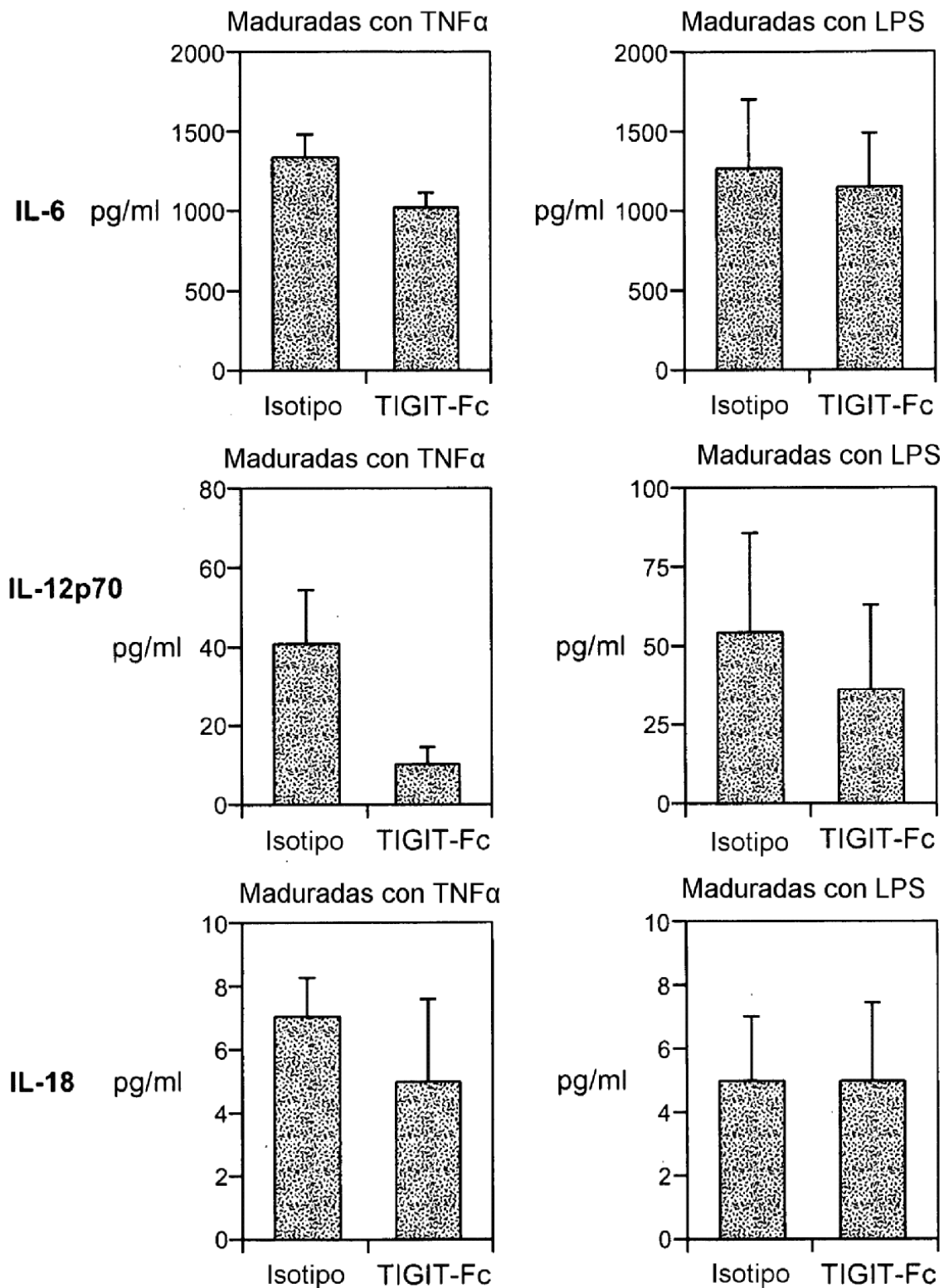


FIG. 22C

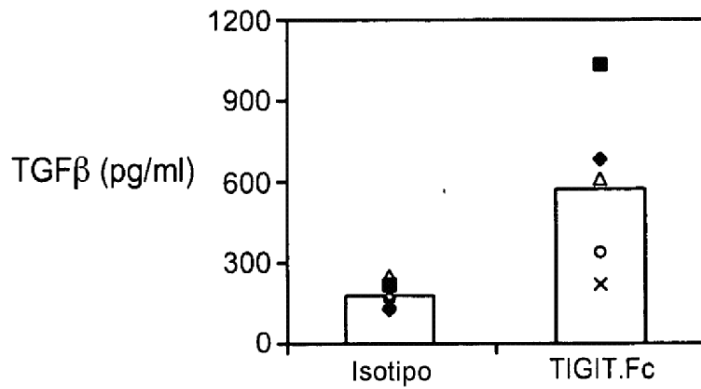


FIG. 22D

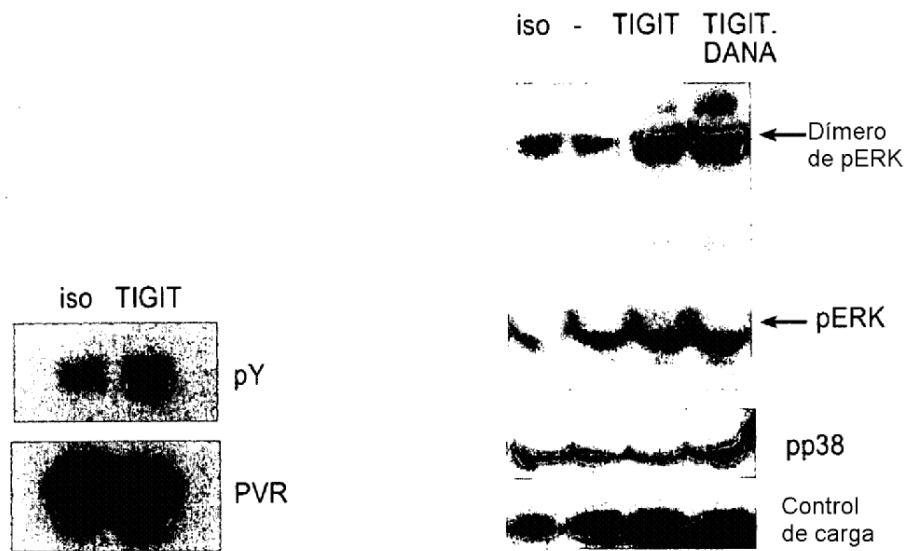


FIG. 23A

FIG. 23B

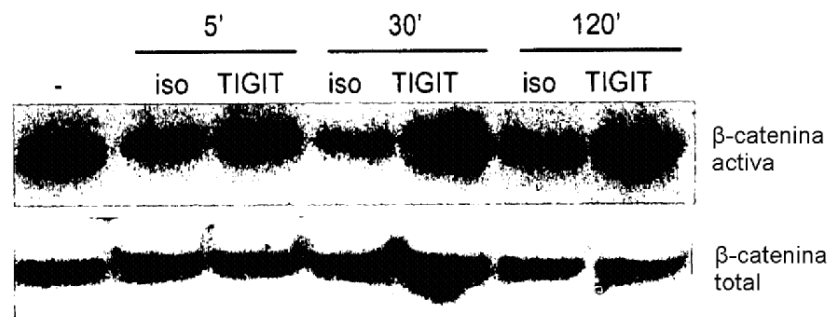


FIG. 23C

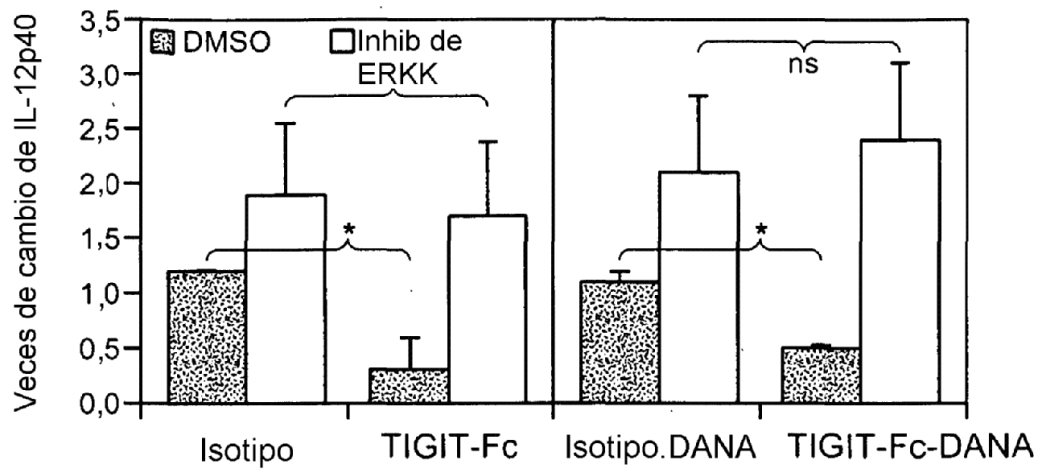


FIG. 24A

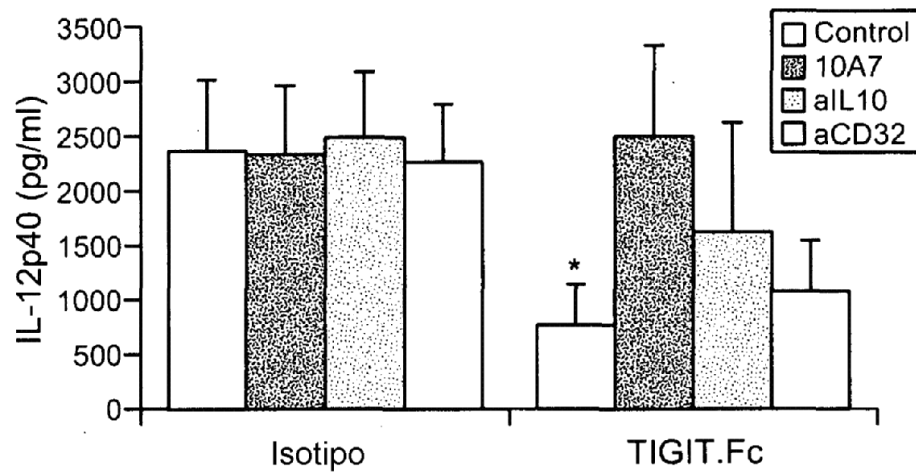


FIG. 24B

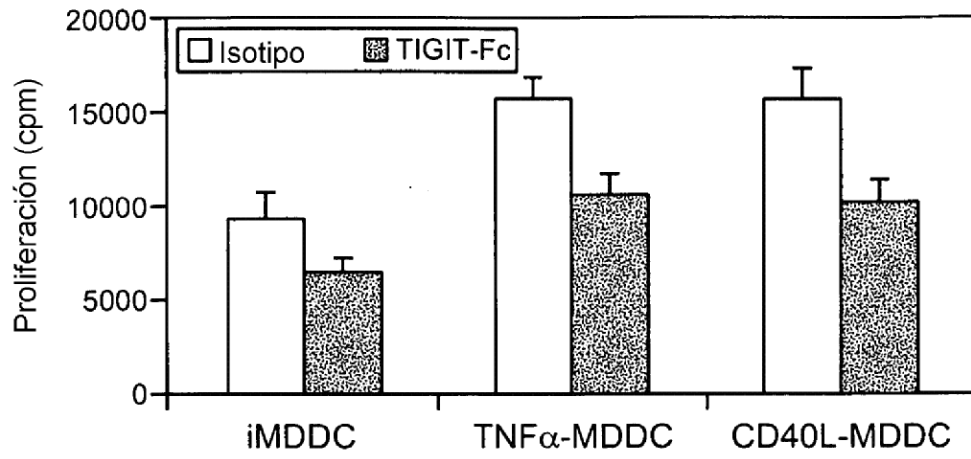


FIG. 25A

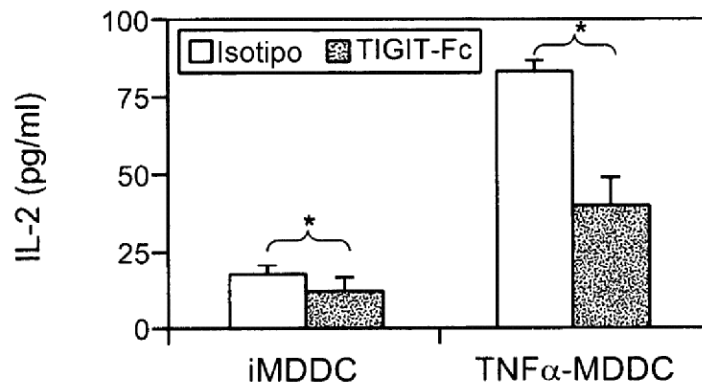


FIG. 25B

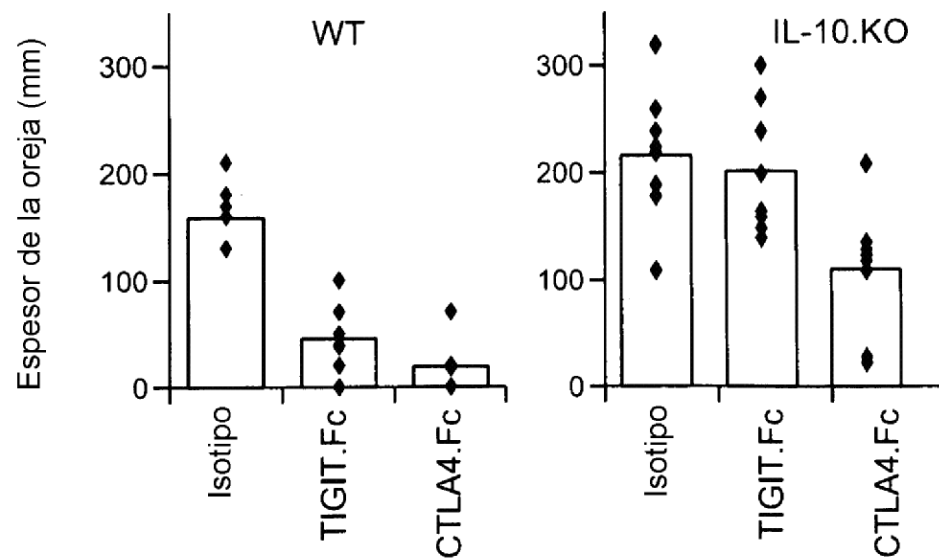


FIG. 27A

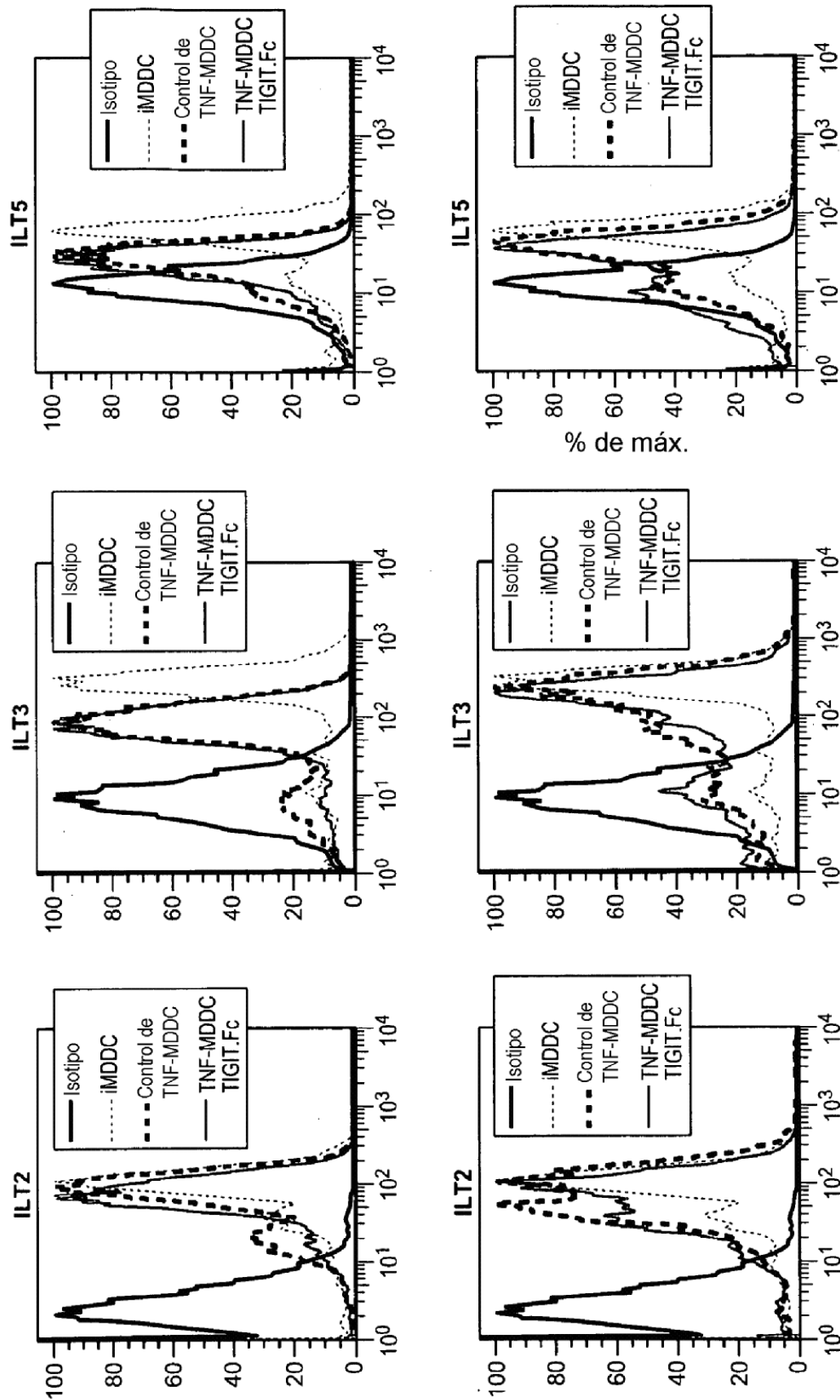


FIG. 26

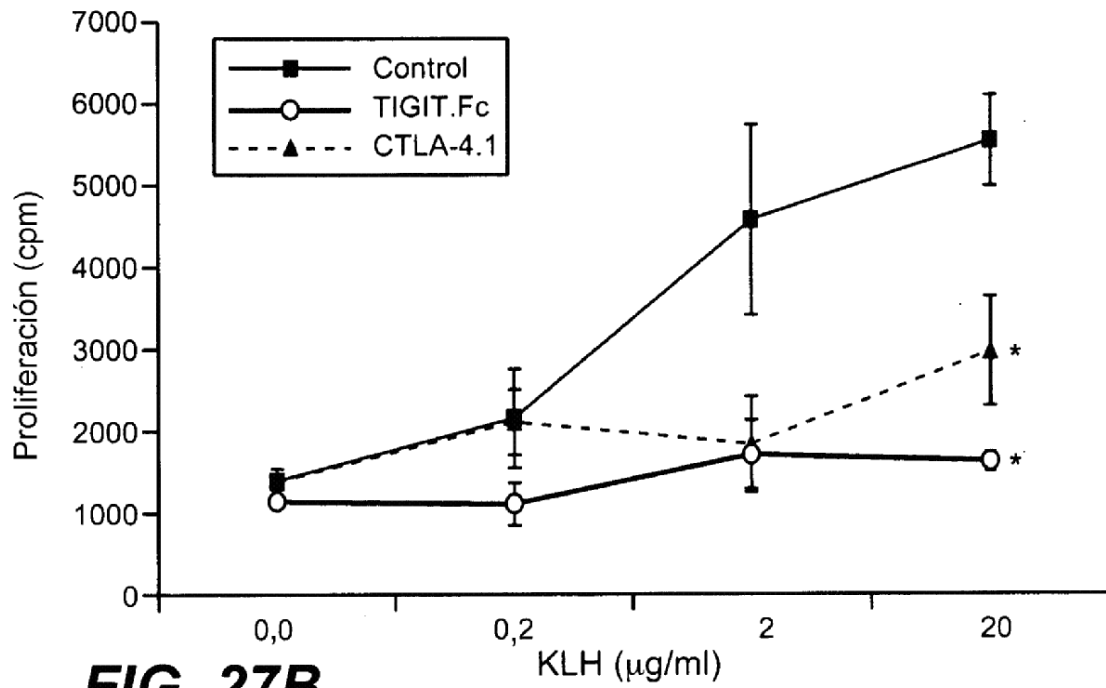


FIG. 27B

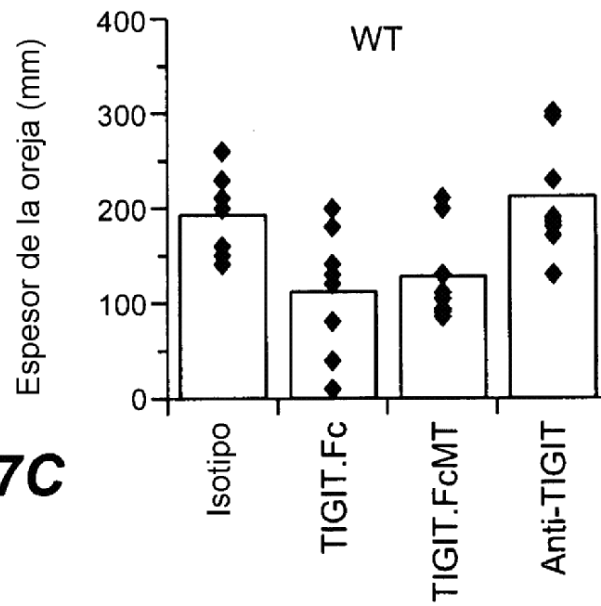
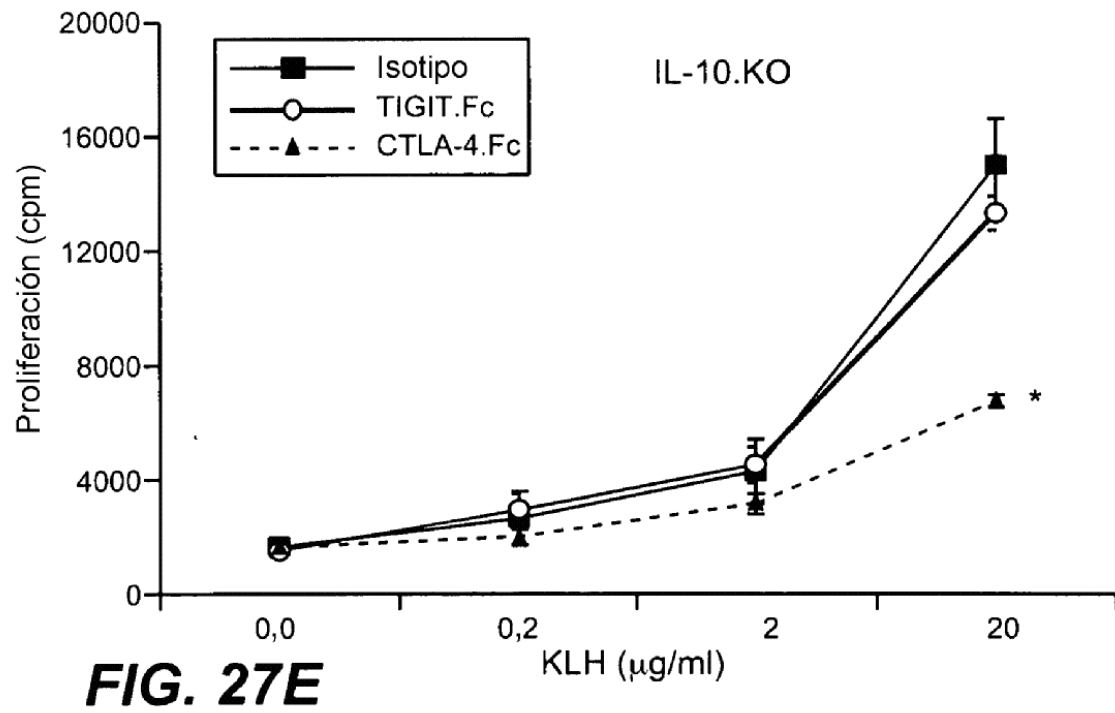
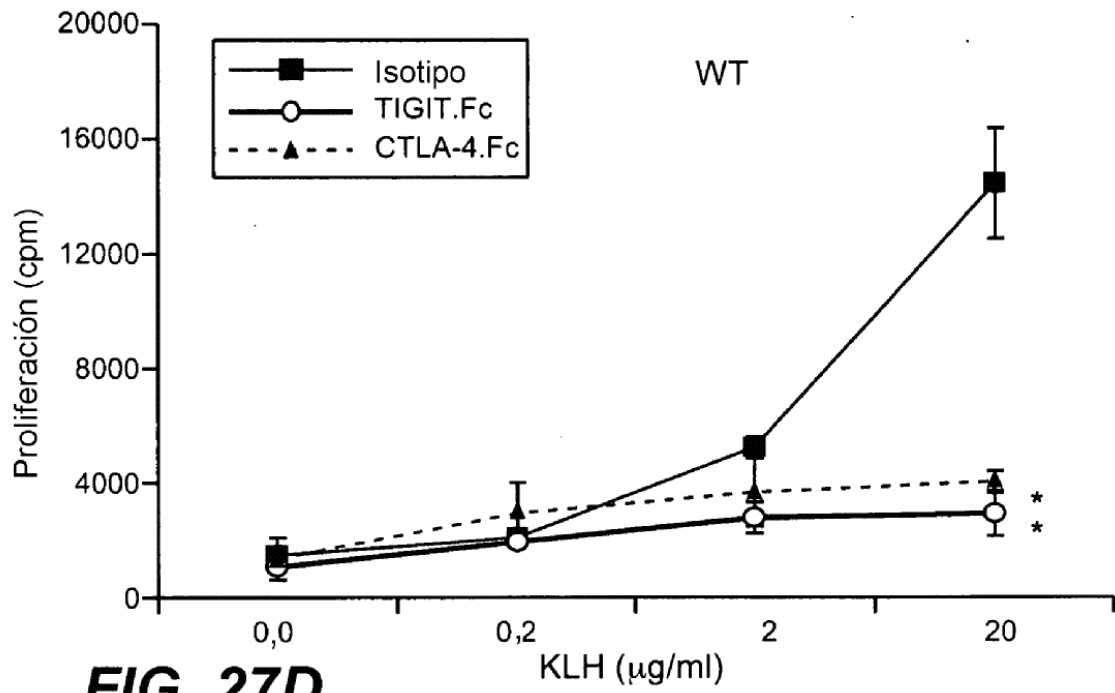
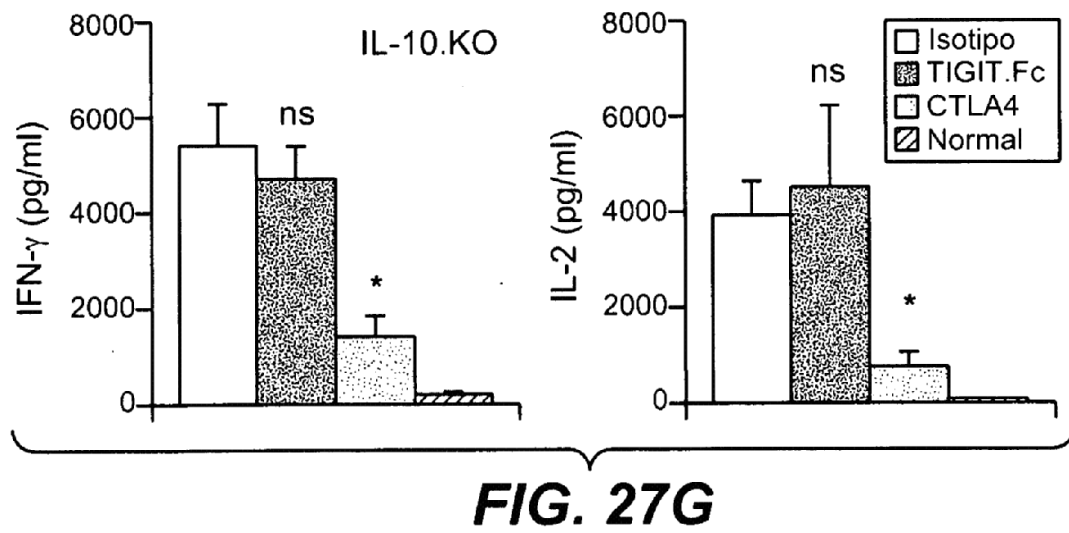
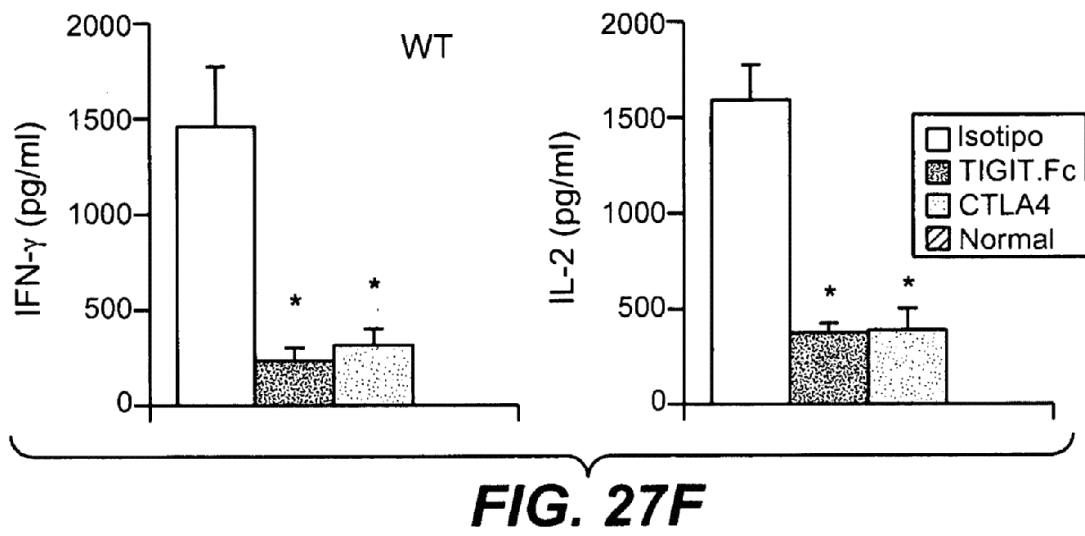


FIG. 27C





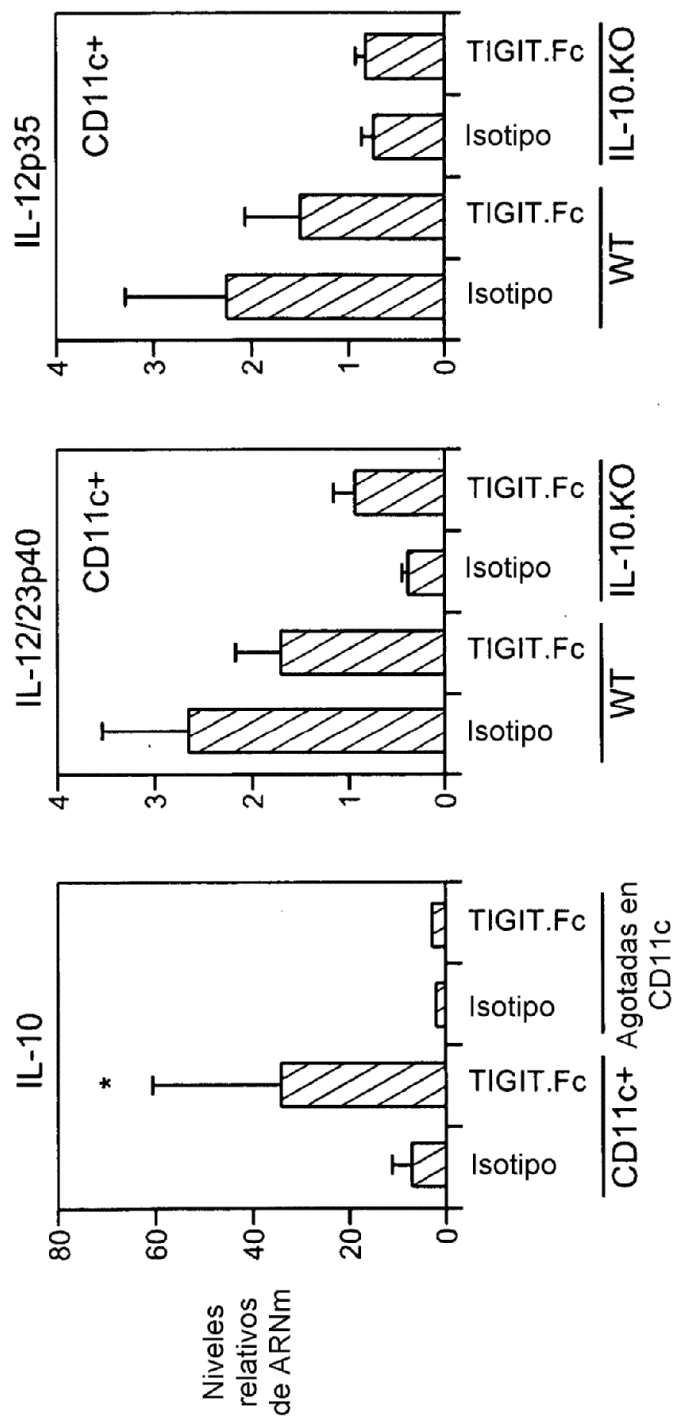


FIG. 27H

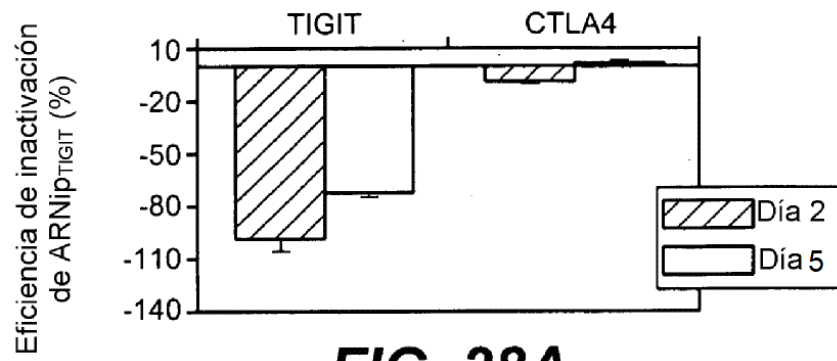


FIG. 28A

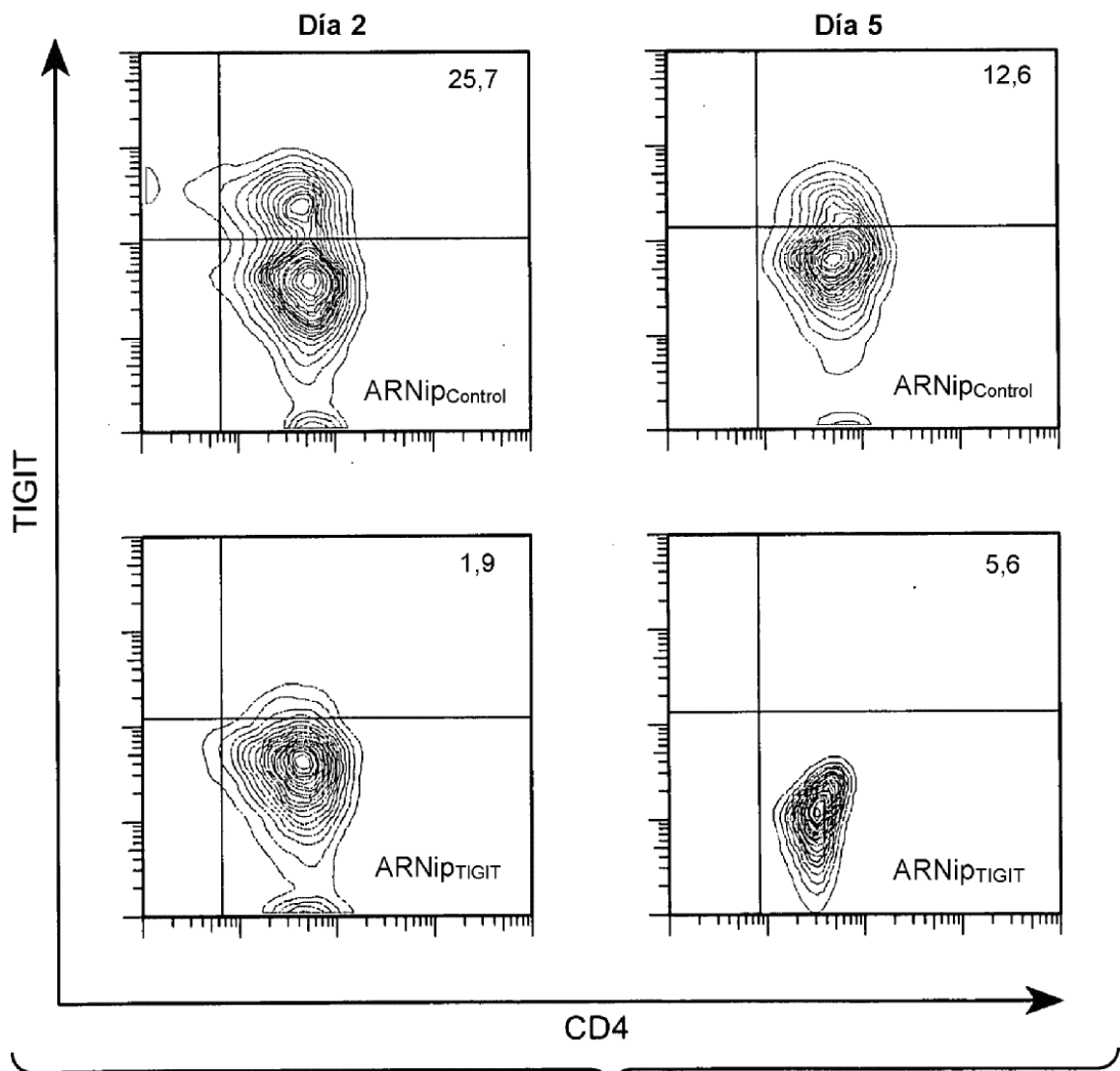


FIG. 28B

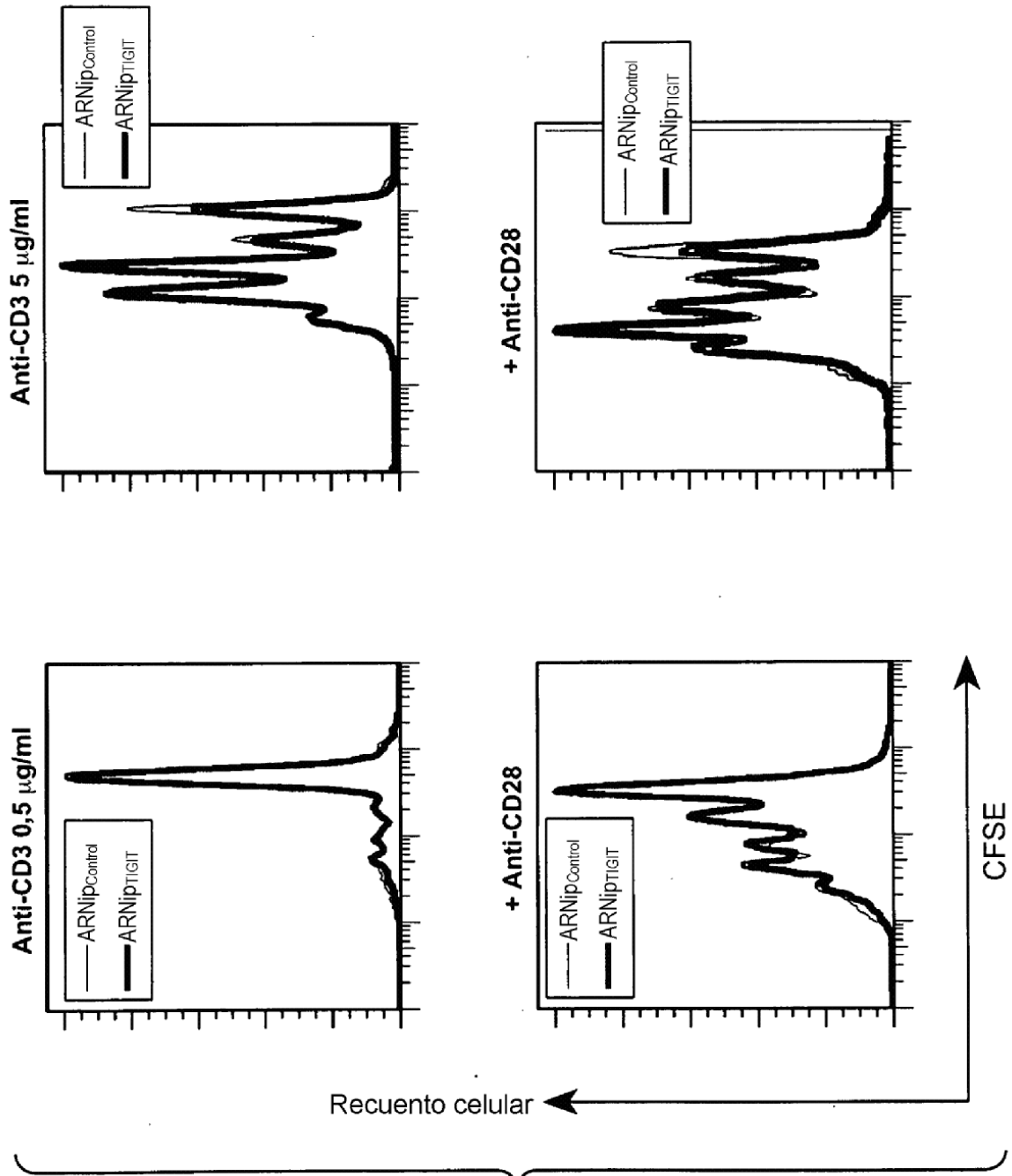


FIG. 28C

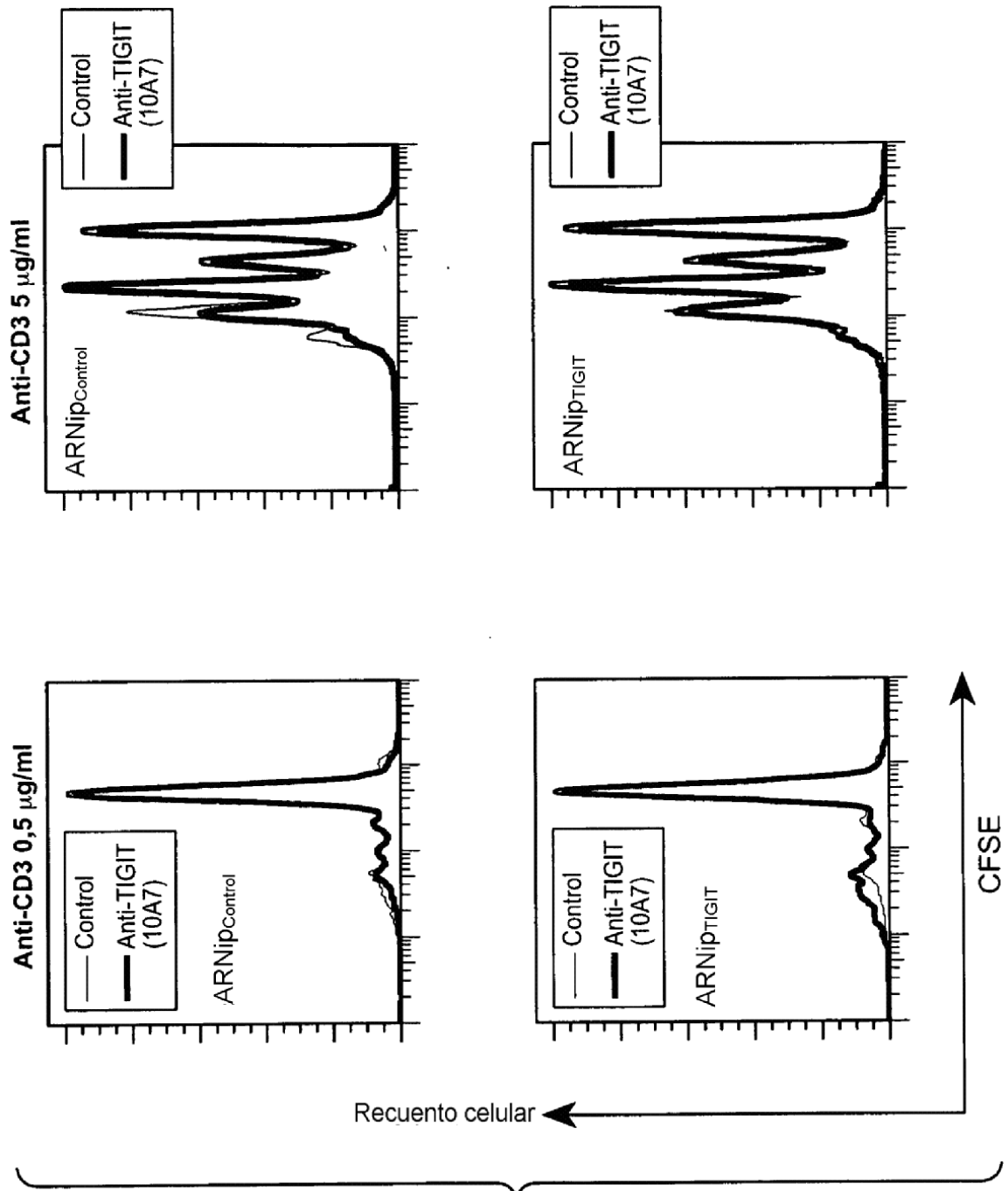


FIG. 28D

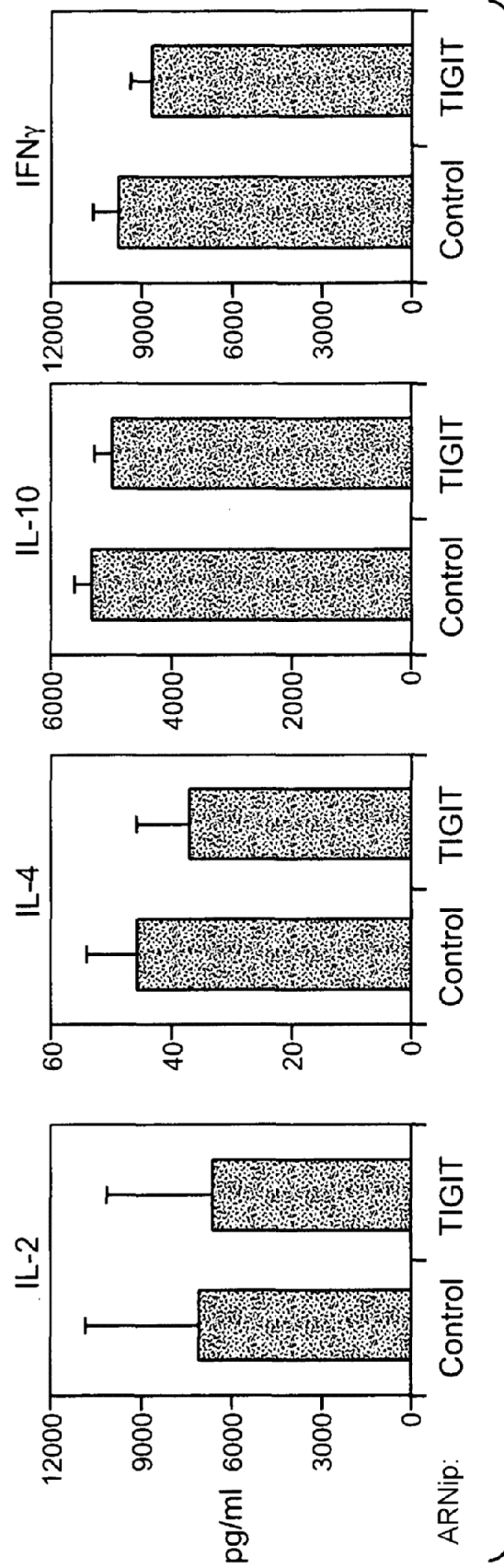
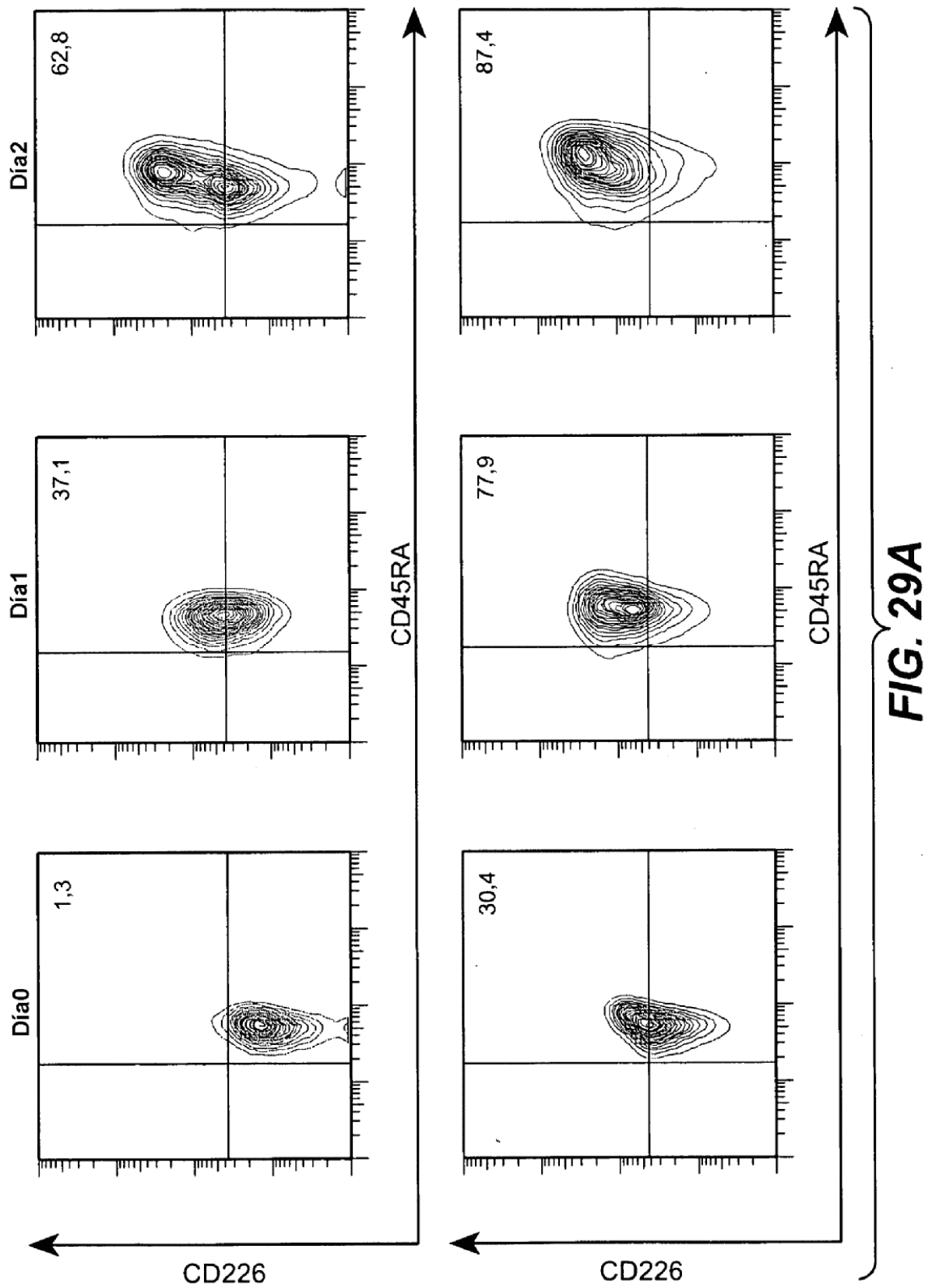


FIG. 28E



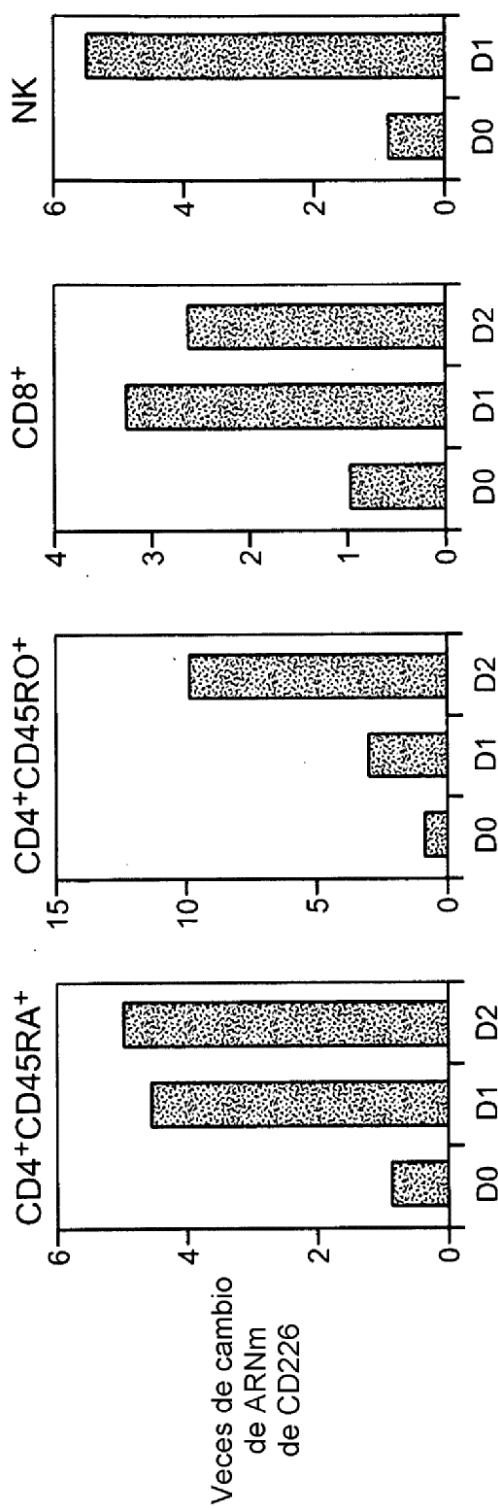


FIG. 29B

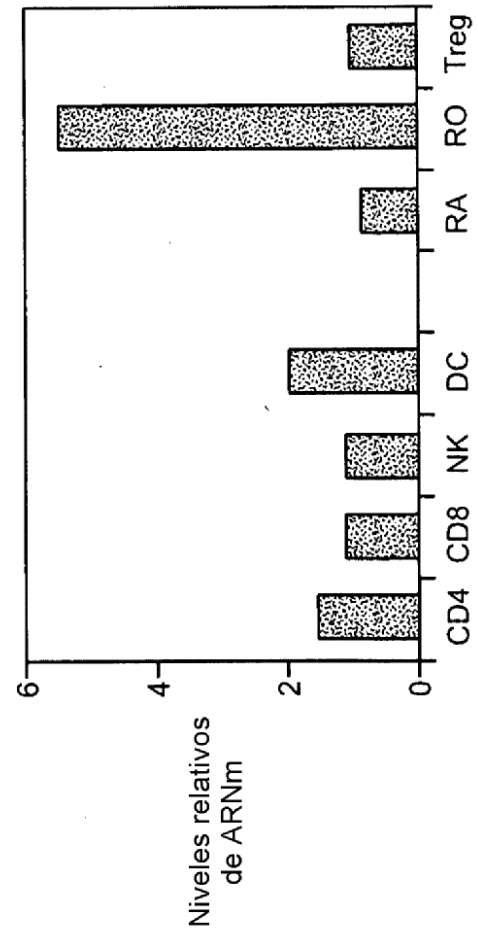


FIG. 29C

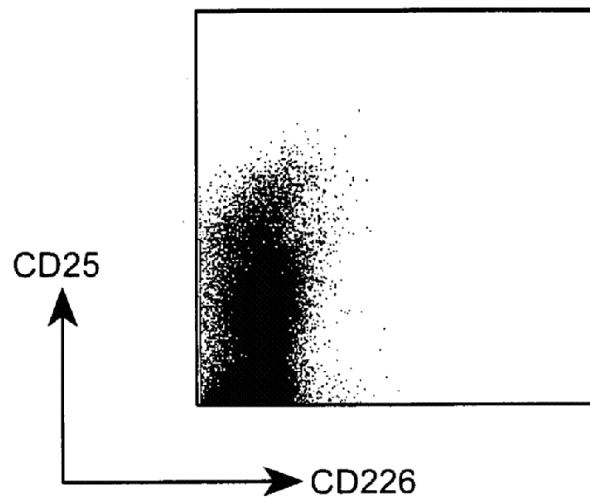


FIG. 29D

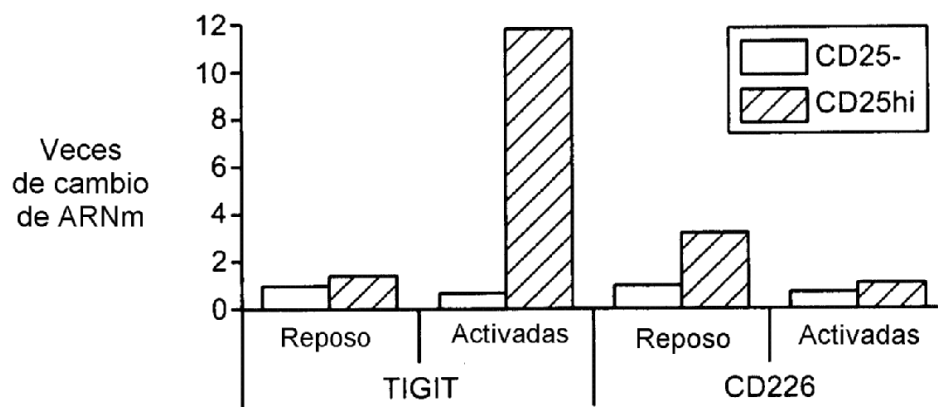
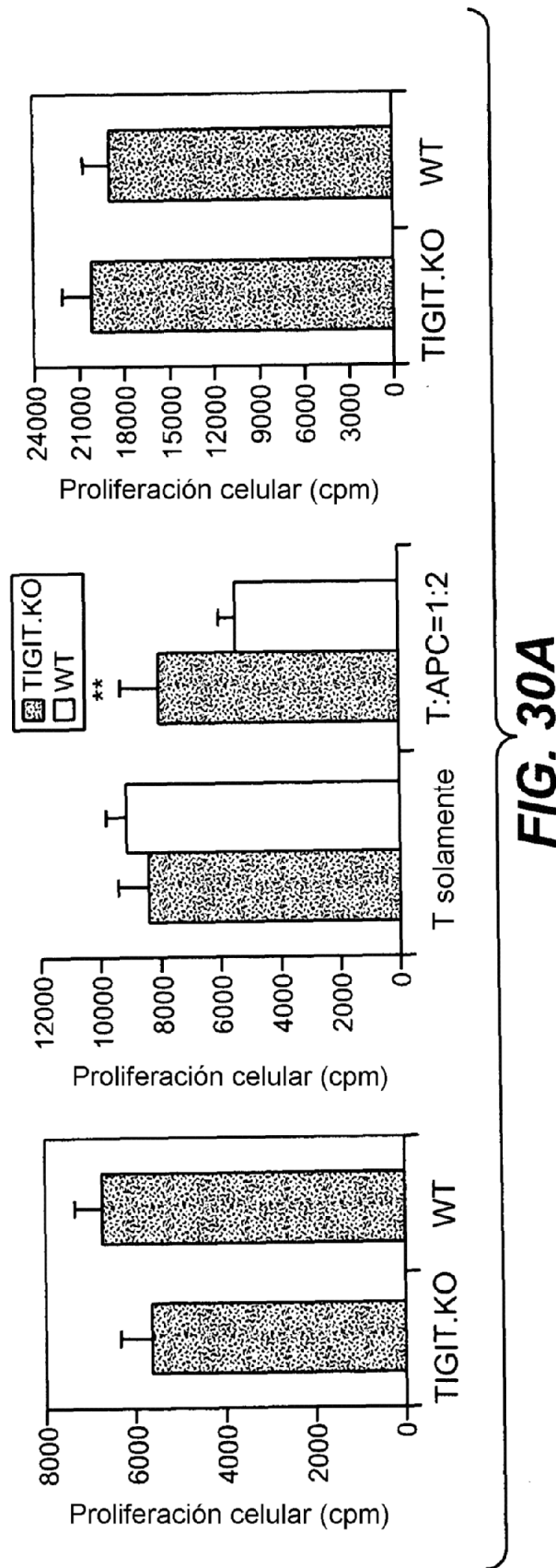


FIG. 29E



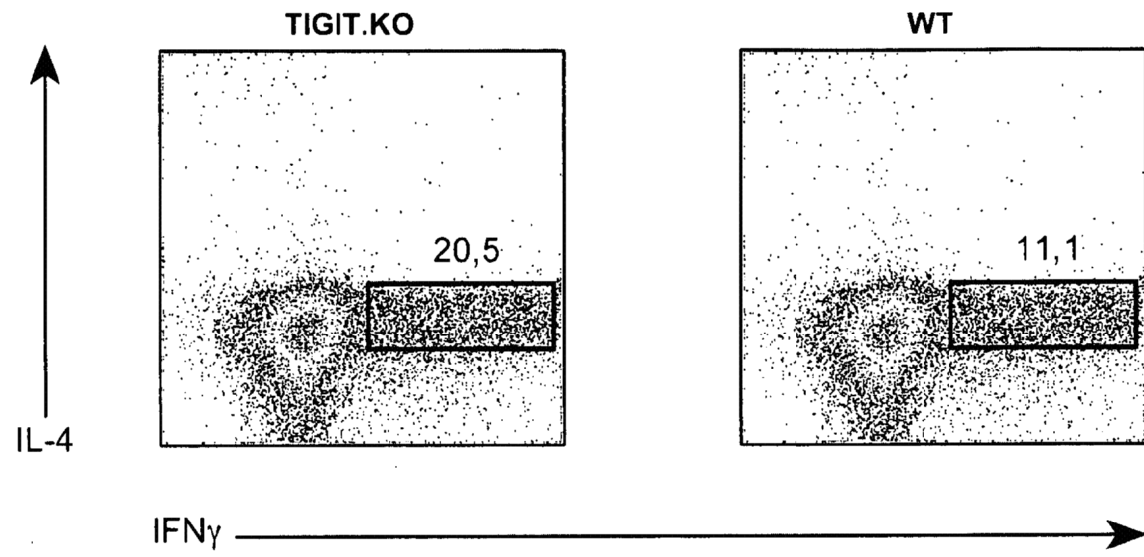


FIG. 30B

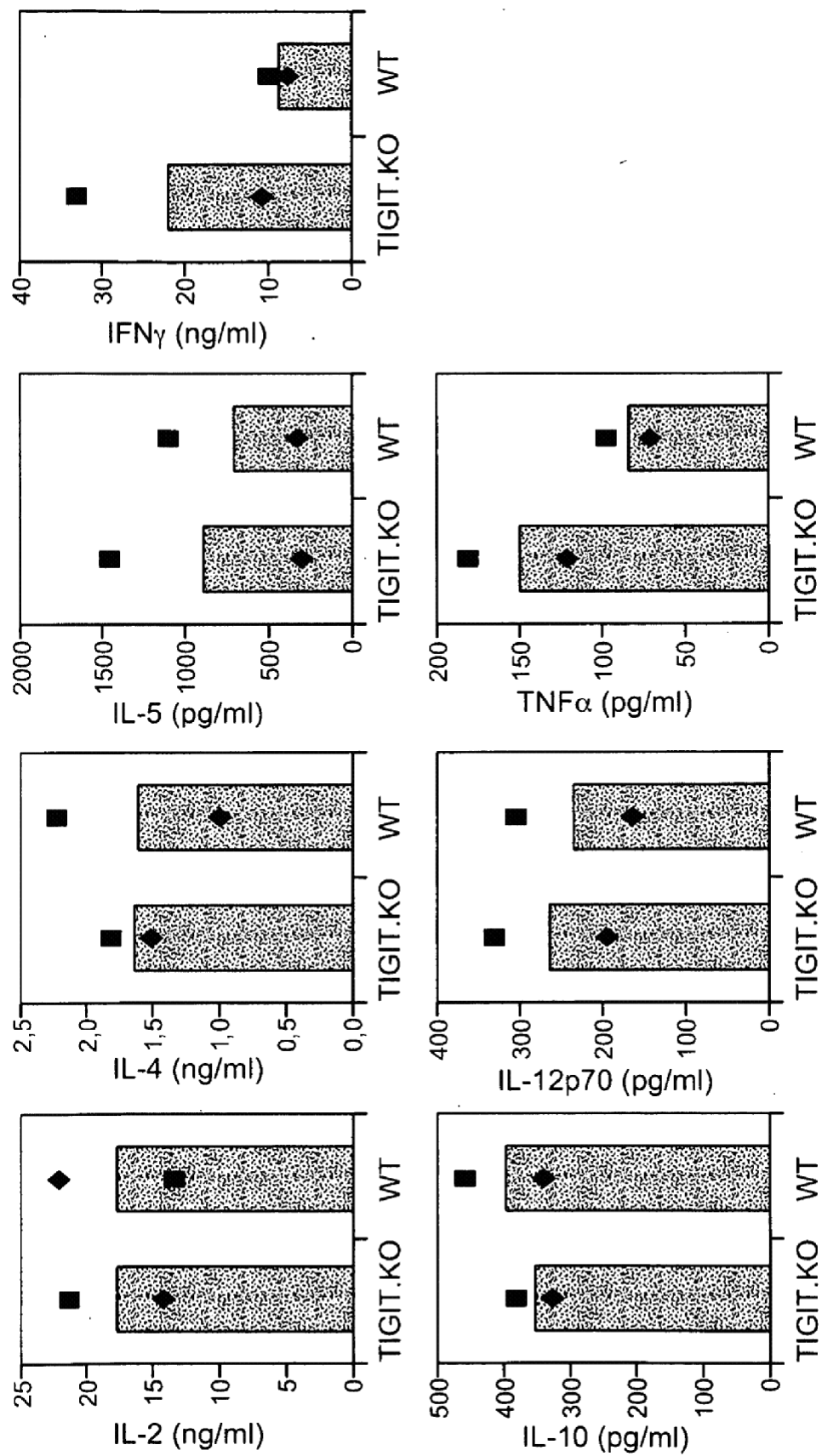


FIG. 30C