(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 774 320**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2017 PCT/IB2017/001256**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018 WO18033798**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2017 E 17797429 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3347379**

(54) Título: **Anticuerpos anti-TIGIT, anticuerpos anti-PVRIG y combinaciones de los mismos**

(30) Prioridad:

17.08.2016 US 201662376334 P
17.08.2016 US 201662376335 P
03.11.2016 US 201662417217 P
28.03.2017 US 201762477974 P
01.06.2017 US 201762513771 P
01.06.2017 US 201762513916 P
01.06.2017 US 201762513775 P
28.07.2017 US 201762538561 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2020

(73) Titular/es:

COMPUGEN LTD. (100.0%)
26 Harokmim Street
5885849 Holon, IL

(72) Inventor/es:

WHITE, MARK;
KUMAR, SANDEEP;
CHAN, CHRISTOPHER;
LIANG, SPENCER;
STAPLETON, LANCE;
DRAKE, ANDREW W.;
GOZLAN, YOSI;
VAKNIN, ILAN;
SAMEAH-GREENWALD, SHIRLEY;
DASSA, LIAT;
TIRAN, ZOHAR;
COJOCARU, GAD. S.;
KOTTURI, MAYA;
CHENG, HSIN-YUAN;
HANSEN, KYLE;
GILADI, DAVID NISIM;
SAFYON, EINAV;
OPHIR, ERAN;
PRESTA, LEONARD;
THEOLIS, RICHARD;
DESAI, RADHIKA y
WALL, PATRICK

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-TIGIT, anticuerpos anti-PVRIG y combinaciones de los mismos

II. Antecedentes de la invención

Las células T sin estimular deben recibir dos señales independientes de las células presentadoras de antígeno (APC) con el fin de activarse de forma productiva. La primera, Señal 1, es específica de antígeno y ocurre cuando los receptores de antígenos de las células T se encuentran con el complejo antígeno-MHC apropiado en la APC. El destino de la respuesta inmune se determina por una segunda señal, independiente de antígeno (Señal 2) que es suministrada a través de una molécula coestimuladora de las células T que se une a su ligando expresado en APC. Esta segunda señal podría ser bien estimuladora (coestimulación positiva) o inhibidora (coestimulación negativa o coinhibición). En ausencia de una señal coestimuladora, o en presencia de una señal coinhibidora, la activación de las células T se altera o aborta, lo que puede dar lugar a un estado de ausencia de respuesta específica de antígeno (conocida como anergia de las células T), o puede dar lugar a la muerte apoptótica de las células T.

Los pares de moléculas coestimuladoras consisten habitualmente en ligandos expresados en las APC y sus receptores cognados expresados en las células T. Los pares ligando/receptor prototipos de moléculas coestimuladoras son B7/CD28 y CD40/CD40L. La familia B7 consiste en ligandos de proteínas de la superficie celular relacionados estructuralmente, que pueden proporcionar una señal estimuladora o inhibidora a una respuesta inmune. Los miembros de la familia B7 están relacionados estructuralmente, con el dominio extracelular que contiene al menos un dominio de inmunoglobulina variable o constante.

Tanto las señales coestimuladoras positivas como negativas juegan papeles críticos en la regulación de las respuestas inmunes mediadas por células, y se ha mostrado que las moléculas que median estas señales son dianas efectivas para la inmunomodulación. Sobre la base de este conocimiento, se han desarrollado varias estrategias terapéuticas que implican la toma como diana de moléculas coestimuladoras, y mostraron ser útiles para la prevención y tratamiento del cáncer activando, o previniendo la inactivación, de respuestas inmunes en pacientes con cáncer y para la prevención y tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias, así como el rechazo del trasplante alogénico, cada uno mediante la inactivación de respuestas inmunes incontroladas, o por la inducción de "señal de inactivación" por la coestimulación negativa (o coinhibición) en sujetos con estas afecciones patológicas.

La manipulación de las señales suministradas por ligandos B7 ha mostrado potencial en el tratamiento de autoinmunidad, enfermedades inflamatorias, y rechazo de trasplantes. Las estrategias terapéuticas incluyen el bloqueo de la coestimulación usando anticuerpos monoclonales frente al ligando o frente al receptor de una pareja coestimuladora, o usando proteínas de fusión solubles compuestas por el receptor coestimulador que pueden unirse a y bloquear su ligando apropiado. Otra estrategia es la inducción de la coinhibición usando proteína de fusión soluble de un ligando inhibidor. Estas estrategias se basan, al menos parcialmente, en la deleción eventual de células T auto o alo reactivas (que son responsables de los procesos patogénicos en las enfermedades autoinmunes o trasplante, respectivamente), presumiblemente porque, en ausencia de coestimulación (que induce los genes de supervivencia celular), las células T se vuelven altamente susceptibles a la inducción de la apoptosis. Así, los agentes nuevos que son capaces de modular señales coestimuladoras, sin comprometer la capacidad del sistema inmune de defender frente a patógenos, son altamente ventajosos para el tratamiento y prevención de dichas afecciones patológicas.

Las rutas coestimuladoras juegan un papel importante en el desarrollo tumoral. De forma interesante, se ha mostrado que los tumores evaden la destrucción inmune impidiendo la activación de las células T a través de la inhibición de factores coestimuladores en las familias B7-CD28 y TNF, así como atrayendo células T reguladoras, que inhiben las respuestas antitumorales de las células T (véase Wang (2006), "Immune Suppression by Tumor Specific $CD4^+$ Regulatory T cells in Cancer", *Semin. Cancer. Biol*. 16:73-79; Greenwald, et al. (2005), "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol*. 23:515-48; Watts (2005), "TNF/TNFR Family Members in Co-stimulation of T Cell Responses", *Ann. Rev. Immunol*. 23:23-68; Sadum, et al., (2007) "Immune Signatures of Murine and Human Cancers Reveal Unique Mechanisms of Tumor Escape and New Targets for Cancer Immunotherapy", *Clin. Canc. Res*. 13(13): 4016-4025). Dichas moléculas coestimuladoras expresadas en tumores se han convertido en biomarcadores atractivos para el cáncer y pueden servir como antígenos asociados a tumores (TAA). Además, las rutas coestimuladoras se han identificado como puntos de control inmunológicos que atenúan las respuestas inmunes dependientes de las células T, tanto a nivel del inicio como de la función efectora en las metástasis tumorales. Como las vacunas contra el cáncer preparadas por ingeniería continúan mejorando, cada vez resulta más claro que dichos puntos de control inmunológicos son una barrera importante para la capacidad de las vacunas de inducir respuestas antitumorales terapéuticas. A este respecto, las moléculas coestimuladoras pueden servir como adyuvantes para la inmunoterapia del cáncer activa (vacunación) y pasiva (mediada por anticuerpos), proporcionando estrategias para frustrar la tolerancia inmune y estimular el sistema inmune.

Durante la última década, se han desarrollado agonistas y/o antagonistas de varias proteínas coestimuladoras para tratar enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos, alergia y cáncer. Por ejemplo, CTLA4-Ig (Abatacept, Orencia®) está aprobado para el tratamiento de AR, CTLA4-Ig mutada (Belatacept, Nulojix®) para la prevención de rechazo de trasplante de riñón agudo y el anticuerpo anti-CTLA4 (Ipilimumab, Yervoy®), se ha aprobado recientemente para el tratamiento de melanoma. Se han aprobado otros reguladores de la coestimulación, tales como los anticuerpos anti-

PD-1 de Merck (Keytruda®) y BMS (Opdivo®), se han aprobado para los tratamientos del cáncer y también se están ensayando para infecciones virales.

Sin embargo, aunque la monoterapia con anticuerpos inhibidores anti-puntos de control ha mostrado ser prometedora, varios estudios (Ahmadzadeh et al., Blood 114: 1537 (2009), Matsuzaki et al., PNAS 107(17):7875-7880 (2010), Fourcade et al., Cancer Res. 72(4):887-896 (2012) y Gros et al., J. Clinical Invest. 124(5):2246 (2014)) que examinan linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) han mostrado que los TIL expresan comúnmente múltiples receptores de puntos de control. Además, es probable que los TIL que expresan múltiples puntos de control sean de hecho los más reactivos con los tumores. Por el contrario, las células T no reactivas con los tumores en la periferia expresan más probablemente un único punto de control. El bloqueo de los puntos de control con anticuerpos monoespecíficos de longitud completa es probablemente no discriminatorio respecto a la desrrepresión de los TIL reactivos con los tumores frente a células T que expresan reactivas con autoantígenos que se asume que contribuyen a las toxicidades autoinmunes.

Una diana de interés es PVRIG. PVRIG, también denominada Proteína que Contiene Dominio de Inmunoglobulina Relacionado con el Receptor de Poliovirus, Q6DKI7 o C7orf15, es una proteína de dominio transmembrana de 326 aminoácidos de longitud, con un péptido señal (que abarca desde el aminoácido 1 al 40), un dominio extracelular (que abarca desde el aminoácido 41 al 171), un dominio transmembrana (que abarca desde el aminoácido 172 al 190) y un dominio citoplásmico (que abarca desde el aminoácido 191 al 326). PVRIG se une a la proteína relacionada con el receptor de Poliovirus 2 (PVLR2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador de la entrada del herpesvirus B, (HVEB) una glicoproteína de membrana plasmática humana), el compañero de unión de PVRIG.

Otra diana de interés es TIGIT. TIGIT es un receptor coinhibidor que está altamente expresado en células T CD4+ efectoras y reguladoras (Treg), células T CD8+ efectoras, y células NK. Se ha mostrado que TIGIT atenúa la respuesta inmune por (1) señalización directa, (2) señalización inducida por ligando, y (3) competición con y disrupción de la señalización por el receptor coestimulador CD226 (también conocido como DNAM-1). La señalización de TIGIT ha sido la mejor estudiada en las células NK, donde se ha demostrado que la unión con su ligando cognado, receptor de poliovirus (PVR, también conocido como CD155), suprime directamente la citotoxicidad de las células NK a través de su dominio citoplásmico ITIM. Se ha mostrado que la inactivación del gen de TIGIT o el bloqueo con anticuerpos de la interacción TIGIT/PVR aumenta la muerte de células NK in vitro, así como exacerba las enfermedades autoinmunes in vivo. Además de sus efectos directos en las células T y NK, TIGIT puede inducir la señalización mediada por PVR en células dendríticas o tumorales, dando lugar al incremento en la producción de citoquinas antiinflamatorias, tales como IL10. En las células T, TIGIT también puede inhibir las respuestas de linfocitos mediante la disrupción de la homodimerización del receptor coestimulador CD226, y compitiendo con él para unirse a PVR.

TIGIT está altamente expresado en linfocitos, incluyendo Linfocitos Infiltrantes de Tumores (TIL) y Tregs, que se infiltran en diferentes tipos de tumores. PVR también se expresa ampliamente en tumores, lo que sugiere que el eje de señalización TIGIT-PVR puede ser un mecanismo de escape inmune dominante para el cáncer. Notablemente, la expresión de TIGIT está firmemente correlacionada con la expresión de otro receptor coinhibidor importante, PD1. TIGIT y PD1 se coexpresan en los TIL de numerosos tumores humanos y murinos. A diferencia de TIGIT y CTLA4, la inhibición de PD1 de las respuestas de las células T no implica la competición para la unión al ligando con un receptor coestimulador.

Por consiguiente, TIGIT es una diana atractiva para la terapia con anticuerpos monoclonales, y además en combinación con anticuerpos adicionales incluyendo anticuerpos anti-PVRIG.

III. Resumen breve de la invención

La invención se define por las reivindicaciones y cualesquiera otros aspectos o realizaciones mostrados en la presente memoria que no se encuentran en el alcance de las reivindicaciones solo son para información.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden un dominio de unión a antígeno que se une a TIGIT humano (SEQ ID NO:97) que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 160 y un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 165. Se describe un dominio de unión a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 150 y un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 155 o el dominio de unión a antígeno comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 560 y un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO:565.

En un aspecto adicional, la invención proporciona composición que comprende anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicha VH comprende la SEQ ID NO: 160 y una cadena ligera que comprende VL-VC, en donde dicha VL que comprende la SEQ ID NO: 165 y VC es bien kappa o lambda. El anticuerpo descrito puede comprender una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde la VH comprende la SEQ ID NO: 150; y una cadena ligera que comprende VL-VC, en donde dicha VL que comprende la SEQ ID NO: 159 y VC es bien kappa o lambda. Adicionalmente, el anticuerpo descrito puede comprender una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde la VH comprende la SEQ ID NO:560; y una cadena ligera que comprende VL-VC, en donde dicha VL que comprende la SEQ ID NO: 565 y VC es bien kappa o lambda.

En algunos aspectos, la secuencia de la CH1-bisagra-CH2-CH3 se selecciona de IgG1, IgG2 y IgG4 humana, y variantes de las mismas. En algunos aspectos, la cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 164 y la cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 169.

En un aspecto adicional, las composiciones pueden comprender además un segundo anticuerpo que se une a una proteína receptora de punto de control humana, que puede ser PD-1 humana o PVRIG humana. El segundo anticuerpo puede comprender un dominio de unión a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:5 y un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 10, o una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 14.

En un aspecto más, la invención proporciona composiciones de ácido nucleico que comprenden un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 160 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 165. Alternativamente, las composiciones de ácido nucleico descritas comprenden un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 150 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 155. Alternativamente, las composiciones de ácido nucleico descritas comprenden un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:560 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO:565.

En un aspecto más, la invención proporciona composiciones de vector de expresión que comprenden estas composiciones de ácido nucleico también se proporcionan, tal como un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico y un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico, o alternativamente un vector de expresión que comprende tanto un primer como un segundo ácido nucleico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona células huésped que comprenden las composiciones del vector de expresión, y métodos para preparar los anticuerpos que comprenden cultivar las células huésped en condiciones en donde se producen los anticuerpos y recuperar el anticuerpo.

En un aspecto más, la invención proporciona anticuerpos anti-PVRIG que comprenden una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 14. La descripción proporciona además anticuerpos que tienen una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 19; y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO:24.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-PVRIG (bien CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P) se coadministra con un segundo anticuerpo que se une a una proteína receptora de punto de control humana, tal como un anticuerpo que se une a PD-1.

En un aspecto más, un anticuerpo anti-PVRIG (bien CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P)) se coadministra con un segundo anticuerpo que se une a una proteína receptora de punto de control humana, tal como un anticuerpo que se une a TIGIT humano, tal como CPA.9.086 o CPA.9.083 o CHA.9.547.13.

En un aspecto más, la descripción proporciona composiciones de ácido nucleico que comprenden un primer ácido nucleico que codifica la cadena pesada bien de CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P)) y un segundo ácido nucleico que codifica la cadena ligera bien de CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P), respectivamente.

En un aspecto más, la invención proporciona composiciones de vector de expresión que comprenden estas composiciones de ácido nucleico también se proporcionan, tal como un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico y un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico, o alternativamente un vector de expresión que comprende tanto el primer como el segundo ácido nucleico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona células huésped que comprenden las composiciones de vector de expresión, y métodos para preparar los anticuerpos que comprenden cultivar las células huésped en condiciones en donde se producen los anticuerpos are y recuperar el anticuerpo.

En un aspecto más, la descripción proporciona métodos que comprenden: a) proporcionar una población de células de una muestra de tumor de un paciente; b) teñir dicha población con anticuerpos marcados que se unen a: i) la proteína TIGIT; ii) la proteína PVR; iii) la proteína PD-1; iv) la proteína PD-L1; y v) un control de isotipo; c) operar la separación celular activada por fluorescencia (FACS); d) para cada uno de TIGIT, PVR, PD-1 y PD-L1, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína en relación con dicho anticuerpo de control de isotipo; en donde si el porcentaje de células positivas es ≥ 1 % para los 4 receptores, e) administrar anticuerpos frente a TIGIT y PD-1 a dicho paciente.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona métodos que comprenden: a) proporcionar una población de células de una muestra de tumor de un paciente; b) teñir dicha población con anticuerpos marcados que se unen a: i) la proteína PVRIG; ii) la proteína PVRL2; iii) la proteína PD-1; iv) la proteína PD-L1; y v) un control de isotipo; c) operar la separación celular activada por fluorescencia (FACS); d) para cada uno de PVRIG, PVRL2, PD-1 y PD-L1, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína en relación con dicho anticuerpo de

control de isotipo; en donde si el porcentaje de células positivas es ≥ 1 % para los 4 receptores, e) administrar anticuerpos frente a PVRIG y PD-1 a dicho paciente.

En un aspecto más, la descripción proporciona métodos que comprenden a) proporcionar una población de células de una muestra de tumor de un paciente; b) teñir dicha población con anticuerpos marcados que se unen a: i) la proteína PVRIG; ii) la proteína PVRL2; iii) la proteína TIGIT; iv) la proteína PVR; y v) un control de isotipo; c) operar la separación celular activada por fluorescencia (FACS); d) para cada uno de PVRIG, PVRL2, TIGIT y PVR, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína en relación con dicho anticuerpo de control de isotipo; en donde si el porcentaje de células positivas es ≥ 1 % para los 4 receptores, e) administrar anticuerpos frente a PVRIG y TIGIT a dicho paciente.

IV. Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de longitud completa de PVRIG humana (mostrando dos diferentes puntos de partida de metionina). El péptido señal está subrayado, el ECD está doblemente subrayado.

La Figura 2 representa la secuencia de la proteína relacionada con el receptor de poliovirus humano 2 (PVLR2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador de entrada del herpesvirus B, (HVEB)), el compañero de unión de PVRIG. PVLR2 es una glicoproteína de la membrana plasmática humana.

La Figura 3A y B representa las cadenas variables pesada y ligera, así como las secuencias de vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de cada uno de los anticuerpos CHA enumerados de la invención, CHA.7.518.1.H4(S241P), y CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

Figura 4A y B los anticuerpos frente a PVRIG incrementan la proliferación de las células T en la MLR. Los porcentajes de células con CFSE bajo se muestran a partir de los ensayos de MLR tratados con los anticuerpos frente a PVRIG indicados. Cada gráfico representa un donante individual de células T CD3. Los experimentos se describen en el Ejemplo 23 de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria.

Figura 5 A y B características de unión del anticuerpo de hibridoma frente a PVRIG a líneas celulares preparadas por ingeniería HEK hPVRIG, células parentales HEK, y células Jurkat. HEK OE denota células HEK hPVRIG, HEK par denota células parentales HEK. Para los datos en Jurkat, gMFIr indica las veces de diferencia en MFI geométrica de la tinción de anticuerpo frente a PVRIG respecto a sus controles. La concentración indica la cual a la que se calculó la gMFIr. No unión indica que el anticuerpo no se une a la línea celular ensayada. Los anticuerpos resaltados son los 'cuatro mejores' anticuerpos de interés.

Figura 6A y B características de unión del anticuerpo de hibridoma frente a PVRIG a PBMC humanas primarias, células que sobreexpresan cyno, y PBMC primarias cyno. Expi cyno OE denota células expi transfectadas de forma transitoria con cPVRIG, expi par denota células parentales expi. gMFIr indica las veces de diferencia en MFI geométrica de la tinción de anticuerpo frente a PVRIG respecto a sus controles. Las concentraciones indican las cuales a las que se calculó la gMFIr. No ensayado indica que los anticuerpos no se ensayaron debido a una ausencia de unión a células HEK hPVRIG, expi cPVRIG humanas, o que no cumple con los requerimientos de unión a subconjuntos de PBMC. Los anticuerpos resaltados son los 'cuatro mejores' anticuerpos de interés. Los experimentos se describen en el Ejemplo 21 de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria.

Figura 7A y B Resumen de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos frente a PVRIG en el ensayo de competición basado en FACS. Se indica la CI_{50} de la inhibición. Ausencia de CI_{50} indica que estos anticuerpos no son bloqueantes. Los anticuerpos resaltados son los 'cuatro mejores' anticuerpos de interés. Los experimentos se describen en el Ejemplo 21 de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria.

Figura 8A y B Los TIL se cocultivaron con células de melanoma 624 a 1:1 E:T durante 18hr en presencia de Ab anti-PVRIG (CPA.7.021; 10ug/ml), anti-TIGIT (clon 10A7; 10ug/ml) o en combinación. Se recogió el sobrenadante y se ensayó en un ensayo de micromatriz de lechos citométrico Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (**A**) y TNF (**B**). Los tratamientos se compararon por el ensayo de la t de Student (*P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01) de muestras en triplicado.

Figura 9A a F Se cocultivaron TIL MART-1 o 209 con células de melanoma 624 a 1:1 E:T durante 18hr en presencia de Ab anti-PVRIG (CPA.7.021; 10ug/ml) , anti-DNAM1 (clon DX11, BD Biosciences No. de Cat. 559787; 10ug/ml) o en combinación. Se recogió el sobrenadante y se ensayó en un ensayo citométrico de micromatriz de lechos Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (**A,D**) y TNF (**B,E**). Los TIL se tiñeron para la expresión en superficie de CD137 (**C,F**).

Figura 10A y B Los TIL (F4) se cocultivaron con células de melanoma 624 a 1:3 E:T durante 18hr en presencia de Ab anti-PVRIG (CPA.7.021; 10ug/ml), anti-TIGIT (clon 10A7; 10ug/ml), anti-PD1 (mAb 1B8, Merck; 10ug/ml) o en combinación. Se recogió el sobrenadante y se ensayó en un ensayo citométrico de micromatriz de lechos Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (**A**) y TNF (**B**)

La Figura 11 A a E representan cuatro secuencias humanizadas para cada uno de CHA.7.518, CHA.7.524, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2. Todos los anticuerpos humanizados comprenden la sustitución H4(S241P). Obsérvese que la cadena ligera para CHA.7.538_2 es la misma que para CHA.7.538_1. La "HI" de cada uno es un "intercambio de CDR" sin cambios en el marco humano. Las secuencias posteriores alteran los cambios en marco mostrados en un tamaño de letra mayor en negrita. Las secuencias de CDR se indican en negrita. Las definiciones de las CDR son AbM del sitio de internet www.bioinf.org.uk/abs. Las secuencias de la línea germinal y de unión humanas de IMGT® el sistema de información ImMunoGeneTics® internacional www.imgt.org (fundador y director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia). La numeración de residuos mostrada como secuencial (seq) o según Chothia del sitio de internet www.bioinf.org.uk/abs/ (AbM). "b" indica cadena lateral enterrada; "p" indica parcialmente enterrada; "i" indica cadena lateral en la interfase entre los dominios VH y VL. Las diferencias en las secuencias entre las líneas germinales humanas y murinas indicadas por un asterisco (*). Las mutaciones potenciales adicionales en los marcos se indican por debajo de la secuencia. Los cambios potenciales en las secuencias de CDR se indican por debajo de cada secuencia de CDR como se indican en la figura (#sustituciones de desamidación: Q/S/A; estas pueden prevenir la desamidación de la asparagina (N). @ sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H; estas pueden prevenir la oxidación del triptófano; @ sustituciones de oxidación de metionina: L/F/A).

La Figura 12A a E representa una recopilación de las secuencias humanizadas de tres anticuerpos CHA: CHA.7.518, CHA.7.538.1, y CHA.7.538.2.

La Figura 13 representa esquemas para combinar los anticuerpos humanizados VH y VL CHA. La "VH quim" y "VL quim" son las secuencias variables pesadas y ligeras de ratón unidas a un dominio constante de IgG humana.

Figura 14. Características de unión del anticuerpo de hibridoma frente a PVRIG a PBMC humanas primarias, células que sobreexpresan cyno, y PBMC primarias cyno. Expi cyno OE denota células expi transfectadas de forma transitoria con cPVRIG, expi par denota células parentales expi. gMFIr indica las veces de diferencia en MFI geométrica de la tinción de anticuerpo frente a PVRIG respecto a sus controles. Las concentraciones indican las cuales a las que se calculó la gMFIr. No ensayado indica que los anticuerpos no se ensayaron debido a una ausencia de unión a células HEK hPVRIG, expi cPVRIG humanas, o que no cumple con los requerimientos de unión a subconjuntos de PBMC. Los anticuerpos resaltados son cuatro anticuerpos para los que se hizo la humanización (Véase la Figura 24). Los experimentos se describen en el Ejemplo 21 de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria.

Figura 15. Resumen de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos frente a PVRIG en el ensayo de competición basado en FACS. Se indica la CI50 de la inhibición. Ausencia de CI50 indica que estos anticuerpos no son bloqueantes. Los anticuerpos resaltados son cuatro anticuerpos para los que se hizo la humanización (Véase la Figura 24).

Figura 16. Resumen de la actividad de anticuerpos frente a PVRIG seleccionados en ensayos de citotoxicidad de células NK frente a células Reh y MOLM-13. Las veces de cambio en la citotoxicidad respecto al control se calcularon dividiendo el nivel absoluto de muerte (%) en la condición con anticuerpo frente a PVRIG, por el nivel absoluto de muerte (%) con el anticuerpo control. Las veces de cambio se calculan a partir de la relación efector a diana 5:1.

Figura 17. Alineamiento de secuencias de ortólogos de PVRIG. Las secuencias alineadas del dominio extracelular de PVRIG humano, de cynomolgus, marmota, y rhesus. Las diferencias entre humano y cynomolgus están resaltadas en amarillo.

Figura 18. Unión de anticuerpos anti-PVRIG humano a variantes de PVRIG de cyno, humano, híbrido cyno/humano. Se muestra la unión de anticuerpos a PVRIG de tipo salvaje de cyno (●), PVRIG H61R cyno (■), PVRIG P67S cyno (▲), PVRIG L95R/T97I cyno (▼), y PVRIG humano de tipo salvaje (♦). Las señales de ELISA se representan como una función de la concentración de los anticuerpos.

Figura 19. Correlación del grupo de epítopos y la reactividad cruzada con cyno de los anticuerpos anti-PVRIG humano.

Figura 20A a B (A) Especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) frente a células HEK preparadas por ingeniería para sobreexpresar PVRIG y células parentales HEK. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo. (B) Especificidad de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) frente a células HEK preparadas por ingeniería para sobreexpresar PVRIG y células parentales HEK. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo.

La Figura 21 A a B ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B) de unirse a células Jurkat que expresan de forma endógena PVRIG confirmado por la expresión del ARN. (A) Unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) a células Jurkat. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo. La tinción de isotipo se muestra como un control negativo. (B) Unión de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) a células Jurkat. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo. La tinción de isotipo se muestra como un control negativo. Ambos anticuerpos son capaces de unirse a células Jurkat con una afinidad comparable a células HEK hPVRIG.

La Figura 22 ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) de unirse a células T CD8 que se expandieron por exposición al péptido de CMV (494-503, NLVPMVATV) y que expresan de forma endógena PVRIG confirmado por la expresión del ARN. Unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) a células T CD8 expandidas con el péptido de CMV. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo. La tinción de isotipo se muestra como un control negativo.

Figura 23A a B. (A) Especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) frente a células expi preparadas por ingeniería para sobreexpresar PVRIG de cynomolgus y células parentales expi. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo. Especificidad de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) frente a células expi preparadas por ingeniería para sobreexpresar PVRIG de cynomolgus y células parentales expi. Los datos muestran mediciones de MFI geométrica absoluta (gMFI) como una función de concentración creciente de anticuerpo.

Figura 24A a B. (A) Bloqueo de PVRIG Fc en células HEK por CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Los datos muestran el porcentaje de unión de PVRIG Fc a células HEK como una función de concentración creciente de anticuerpo respecto a la señal máxima inducida por PVRIG Fc y fondo solo secundario. (B) Efecto de CHA.7.544 en la unión de PVRIG Fc a células HEK. Los datos muestran la gMFI absoluta derivada de la unión de PVRIG Fc a células HEK en presencia de concentraciones crecientes de CHA.7.544. La cantidad de unión de PVRIG Fc se detectó por un anticuerpo secundario anti-Fc de ratón conjugado con Alexa 647.

Figura 25 A a B. (A) Bloqueo de PVRL2 Fc a células HEK hPVRIG por CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.538.1.2.H4(S241P), y CHA.7.530.3. Los datos muestran el porcentaje de unión de PVRL2 Fc a células HEK hPVRIG como una función de concentración creciente de anticuerpo respecto a la señal máxima inducida por PVRL2 Fc y fondo solo secundario. (B) Efecto de CHA.7.544 en la unión de PVRL2 Fc a células HEK hPVRIG. Los datos muestran el porcentaje de unión de PVRL2 Fc a células HEK hPVRIG como una función de concentración creciente de anticuerpo respecto a la señal máxima inducida por PVRL2 Fc y fondo solo secundario.

Figura 26. Muestra el porcentaje de la unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) conjugado con Alexa 647 respecto a su señal máxima después de la preincubación de células Jurkat con CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.538.1.2.H4(S241P) no conjugados y un control de isotipo.

Figura 27A a B A) Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), incrementan la proliferación de las células T CD4+. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de células T CD4+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un único donante humano de células T CD4+ cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo anti-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo de IgG. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de células T CD4+ con CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humana. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la proliferación de los tratamientos con el anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes (B) Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), incrementan la proliferación de las células T CD4+ de una manera dependiente de hPVRL2. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de células T CD4+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un único donante humano de células T CD4+ en respuesta al cocultivo con las células CHO-S OKT3 parentales, o CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo anti-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de células T CD4+ con CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento bien con los anticuerpos de isotipo IgG4 humano o isotipo IgG1 de ratón. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la proliferación de los tratamientos con el anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes.

Figura 28A a C. (A) Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), incrementan la proliferación de las células T CD8+. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de células T CD8+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un único donante humano de células T CD8+ (Donante 232) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo anti-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo de IgG. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de células T CD8+ con CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con los anticuerpos de control de isotipo IgG1 de ratón o IgG4 humana. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la proliferación de los tratamientos con anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes. (B) Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), incrementan la proliferación de las células T CD8+. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de células T CD8+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un único donante humano de células T CD8+ (Donante 234) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo anti-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de células T CD8+ con CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con los anticuerpos de isotipo IgG1 de ratón o IgG4 humana. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la proliferación de los tratamientos con anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo

relevantes. (C) Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), incrementan la secreción de IFNγ de células T CD8+. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran los pg/ml de IFNγ producidos (media más desviación estándar) por tres donantes humanos diferentes de células T CD8+ (Donantes 231, 232, y 234) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo anti-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica la producción de IFNγ en la línea base después del tratamiento con el anticuerpo de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de incremento en la secreción de IFNγ de los tratamientos con el anticuerpo anti-PVRIG en comparación con el control de isotipo IgG4.

Figura 29. Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), incrementan de forma consistente la proliferación de las células T CD4+ en múltiples donantes, mientras CHA.7.530.3 y CHA.7.544 no lo hacen. El porcentaje de proliferación respecto al control de isotipo se calculó dividiendo el porcentaje de células T CD4+ con CFSE bajo después del tratamiento con anticuerpo frente a PVRIG sobre el tratamiento con anticuerpo de isotipo para cada donante. El porcentaje de proliferación para el tratamiento con anticuerpo de isotipo se ajustó a cero. Cada símbolo en el gráfico representa un donante diferente.

Figura 30A a D. (A) Efecto dependiente de la dosis de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), en la proliferación de las células T CD4+. Los datos representativos (n ≥ 2) con 2 donantes humanos diferentes muestran el porcentaje medio de células T CD4+ proliferantes después de una titulación de dosis de 66nM a 0,726nM bien con anticuerpos de isotipo IgG4 humano, CHA.7.518.1.H4(S241P), o CHA.7.538.1.2.H4(S241P). La CE50 estimada está en el rango de un único dígito nM. (B) Efecto dependiente de la dosis de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), en la proliferación de las células T CD8+. Los datos representativos (n ≥ 2) con 2 donantes humanos diferentes muestran el porcentaje medio de células T CD8+ proliferantes después de una titulación de dosis de 66nM a 0,264nM bien con anticuerpos de isotipo IgG4 humano, CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.38.1.2, o CHA.7.544. La CE50 estimada está en el rango de un único dígito nM.

Figura 31 A a C. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de TIGIT y PVRIG en TIL y expresión de PVR, PVRL2 en la línea celular de melanoma 624. Los valores representan la relación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) frente al control de isotipo. (B-C) Experimento representativo que muestra la secreción de IFNγ (B) y TNF (C) por los TIL después del cocultivo con células de melanoma 624 a 1:3 E:T durante 18hr en presencia de Ab de control de isotipo, anti-TIGIT (30µg/ml) o anti-PVRIG (10 µg/ml) como mono tratamiento (histogramas azules) o en combinación con anti-TIGIT (histogramas verdes). El porcentaje del efecto de mono tratamiento con Ab se comparó con el tratamiento de control de isotipo mIgG1 y el porcentaje del efecto de tratamiento combinado de Ab se comparó con el mono tratamiento con anti-TIGIT.

Figura 32A a H. Se cocultivaron TIL (209-gp100/463-F4-gp100) con células de melanoma 624 en 1:3 E:T durante 18hr en presencia de los Ab anti-PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538 con o sin anti-TIGIT (aTIGIT) en combinación y se ensayaron para determinar la secreción de citoquinas. El porcentaje del efecto del tratamiento con Ab se comparó con el tratamiento de control de isotipo y se representó la media de 5 experimentos (F4) o 6 experimentos (209). Se calculó el ensayo de la T emparejado de dos colas para cada tratamiento en comparación con isotipo o en combinación en comparación con anti-TIGIT solo, se indican los valores p.

Figura 33A a B. (A) El anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y un anticuerpo anti-TIGIT incrementan la proliferación de las células T CD4+ en comparación con los tratamientos con un único anticuerpo. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de células T CD4+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un único donante humano de células T CD3+ (Donante 143) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de las células T CD4+ proliferantes con CFSE bajo, después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humana. (B) El anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT incrementan la proliferación de las células T CD4+ en comparación con los tratamientos con un único anticuerpo. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje células T CD4+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un único donante humano de células T CD4+ (Donante 201) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de las células T CD4+ proliferantes con CFSE bajo, después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humana. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la proliferación de los tratamientos con el anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes.

Figura 34A a B. (A): La combinación del anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT incrementa la proliferación de las células T CD8+. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de células T CD8+ proliferantes con CFSE bajo (media más desviación estándar) de un donante humano de células T CD8+ representativo (Donante 232) cuando de cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica el porcentaje en la línea base de las células T CD8+ proliferantes con CFSE bajo, después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humana. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la proliferación de los tratamientos con el anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes. (B) La combinación del anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT incrementa la secreción de IFNγ de las células T

CD8+. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran los pg/ml de IFNγ producidos (media más desviación estándar) por un donante humano de células T CD8+ representativo (Donante 232) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica la producción de IFNγ en la línea base después del tratamiento con el anticuerpo de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de incremento o disminución en la secreción de IFNγ de los tratamientos con el anticuerpo anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes.

La Figura 35 representa el diseño del sistema experimental del Ejemplo 2(3).

La Figura 36A a C. muestra un histograma que representa los niveles de expresión de PVRIG (usando Anti-PVRIG humano CHA.7.538.AF647), TIGIT (usando Anti-TIGIT humano Cat. 17-9500-41 eBioscience) y DNAM-1 (usando Anti-CD226-APC humano Cat.338312 biolegend) en TIL. Las veces de expresión se comparan con el control de isotipo (Iso).

Figura 37. Representación resumida del efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en la secreción de IFNγ de TIL. Se cocultivaron los TIL con células CHO-S HLA-A2/B2M que sobreexpresan PVRL2 en una relación E:T de 1:3 durante 18hr en presencia de anticuerpos anti-PVRIG (c518, c538 y 544) o con un anticuerpo anti-TIGIT. Cada punto representa un promedio de los datos de la secreción de IFNγ de los mismos TIL de diferentes experimentos. El porcentaje indicado es la diferencia entre cada tratamiento con anticuerpo en comparación con el control de isotipo. Se calculó el ensayo de la T de dos colas, emparejado, para cada tratamiento en comparación con 544 o en combinaciones, en comparación con anti-TIGIT solo, se indican los valores p. El número de experimentos realizado para cada TIL; 209 (N=3), F4 (N=2), F5 (N=3) y MART1 (N=2).

Figura 38. Representación resumida del efecto de la respuesta a la dosis de c518 y c538 en la secreción de TNF-α de los TIL. Se cocultivaron los TIL con células CHO-S HLA-A2/B2M que sobreexpresan PVRL2 en una relación efector a diana de 1:3 durante 18hr en presencia de anticuerpos anti-PVRIG (c518, c538 o control de isotipo) como se describe en el Ejemplo 2(3).

Figura 39A a C. Se cocultivaron los TIL con células diana CHO-S HLA-A2/B2M que sobreexpresan PVRL2 en una relación E:T de 1:3 durante 18hr en presencia de anticuerpos anti-PVRIG (c518, c538 y 544) o con anticuerpo anti-TIGIT. El porcentaje indicado en las tablas anteriores es la diferencia en el efecto de la secreción de citoquinas de los TIL de cada tratamiento con anticuerpo en comparación con su control de isotipo. El primer experimento se representa en la Figura A y B, y el segundo experimento en la Figura C.

Figura 40. Diseño del ensayo de cocultivo de CHO-S OKT3. Se cocultivaron las células T CD3+ marcadas con CFSE con células CHO-S-OKT3-PVRL2 o con transfección simulada durante 5d. Se analizó el efecto de los Ab anti-PVRIG en la proliferación de las células T y en la secreción de citoquinas.

Figura 41. Efecto de anticuerpos anti-PVRIG en la secreción de IFNγ en células CHO-OKT3 PVRL2 en donante respondedor frente a no respondedor. Se cocultivaron células CD3+ de 2 donantes diferentes con células CHO-S-PVRL2 en una relación 5:1 E:T durante 5d en presencia de Ab anti-PVRIG y se ensayaron para detectar la secreción de citoquinas y la proliferación de las células T. (A) 'donante respondedor' en el que observamos un efecto a los Ab anti-PVRIG. (B) 'donante no respondedor' en el que no observamos efectos al tratamiento con Ab.

Figura 42. Efecto de anticuerpos anti-PVRIG en la proliferación de CD4 y CD8 de un donante respondedor. Se cocultivaron las células T CD3+ marcadas con CFSE con células CHO-S-PVRL2 en una relación 5:1 E:T durante 5d en presencia de Ab anti-PVRIG o Ab anti-TIGIT. El efecto en la proliferación de las células T seleccionando en en CD4 o CD8 se evaluó por citometría de flujo. Se presentan el porcentaje de células proliferantes (CFSE bajo) (A) o número total de células (B) de CD4+CFSE bajo o CD8+CFSE bajo.

Figura 43. Muestra el efecto de anticuerpos anti-PVRIG en la secreción de IFNγ o proliferación de CD8 de un donante respondedor. Se cocultivaron las células CD3+ con células CHO-S-PVRL2 en 5:1 E:T durante 5d en presencia de Ab anti-PVRIG y se ensayaron para determinar (A) secreción de citoquinas y (B) proliferación de células T. El porcentaje del efecto del tratamiento con Ab se comparó con el tratamiento de control de isotipo y se presenta la media de 5 donantes 'respondedores' (respondedores). (C) Niveles de secreción de IFNγ de los mismos 5 donantes después del cocultivo con CHOS-OKT3 PVRL2 como se describe en la sección A y B después de tratamiento con Ab de isotipo frente a anti-PVRIG. El valor p representa la relación del ensayo de T emparejado.

La Figura 44 es una tabla resumen del efecto el tratamiento con los Ab en los donantes ensayados (n=10). Los porcentajes indicados representan el efecto del tratamiento con Ab en un resultado específico (indicado en los encabezamientos de las columnas) en comparación con el control de isotipo relevante. Los donantes 'respondedores' (donantes no. 3, 72,226,345 y ES_001) considerados como 'respondedor' en los que algunos Ab anti-PVRIG (principalmente CHA.7.518) aumentaron IFNγ o la proliferación frente a los controles de isotipo.

La Figura 45 A a B representan los resultados de experimentos con varios anticuerpos. Las afinidades (nM) se muestran en A, con las células HEK hPVRIG siendo las células HEK transformadas con hPVRIG como se discute en la presente memoria y las células Jurkat expresan hPVRIG endógeno. (B) Representa la gMFI usando 4 diferentes

anticuerpos frente a las células T CD8 primarias del Donante 1 y (C) siendo las células T CD8 primarias del Donante 2.

La Figura 46A a B representan interacciones de TIGIT con células CHO. (A) La proteína TIGIT Fc humana se une a las células CHO. Se evaluaron concentraciones graduadas de TIGIT Fc humano y control synagis de IgG1 para determinar su capacidad de unirse a las células CHO en un ensayo de unión basado en FACS. (B) PVR humano se expresa en células T CD4 activadas. Se cocultivaron células T CD4 con células CHO que expresan el scFv del anticuerpo OKT3 y se activaron durante 5 días. En el día 5, las células T CD4 se analizaron para determinar la expresión de PVR y la dilución de CFSE.

La Figura 47A a C representan respuestas antitumorales de anticuerpos anti-mPVRIg y anti-PDL-1 en un modelo de tumor CT26. A-B. Se inyectaron subcutáneamente a grupos de 10 ratones BALB/c 5 x 10^5 células CT26. Después de medir los tumores en el día 4, los ratones se aleatorizaron (volumen tumoral medio de 40 mm3 por grupo) y después se trataron con el mAb designado (100 o 200 µg/dosis IP) seguido de dosis adicionales en los días 7, 11, 14, 18 y 21. A. Los grupos se trataron con 6 dosis de agentes únicos. Anti-PDL-1 frente a control ***p <0,0001. Los volúmenes tumorales se representan como el Volumen medio + SEM. B. Se midieron los volúmenes tumorales dos veces semanalmente. Se indica el número de ratones sin tumor (TF) por grupo. C. Proporciones de supervivencia de grupos asignados; Anti-PDL-1 frente a control **p =0,005.

La Figura 48A a C representan respuestas antitumorales de una combinación de anticuerpos anti-PVRIG y anti-PDL-1 en un modelo de tumor CT26. A-B. Se inyectaron subcutáneamente a grupos de 10 ratones BALB/c 5 x 10^5 células CT26. Después de medir los tumores en el día 7, los ratones se aleatorizaron (volumen tumoral medio de 75 mm^3 por grupo) y después se trataron con el mAb designado (300 µg/dosis IP) seguido de dosis adicionales en los días 11, 14, 18, 21 y 25. A. Los grupos se trataron con 6 dosis de agentes combinados. Anti-PDL-1+mAb 407 frente a control p = 0,0005; anti-PDL-1 y mAb 406 frente a control p=0,056. B. Se midieron los volúmenes tumorales x3 semanalmente. Se indica el número de ratones sin tumor (TF) por grupo. C. Proporciones de supervivencia de grupos asignados; Anti-PDL-1+mAb 407 frente a control *p = 0,0088.

La Figura 49A a D representan las secuencias de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico para la cadena pesada variable (A y B, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico para la cadena ligera variable (C y D, respectivamente) para AB-407 (BOJ-5G4-F4).

La Figura 50 representa las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de IgG1 (con algunas sustituciones de aminoácidos útiles), IgG2, IgG3, IgG4 humanas, IgG4 con una variante de bisagra que encuentra un uso particular en la presente invención, y los dominios constantes de las cadenas ligeras kappa y lambda.

La Figura 51 representa las secuencias de ECD de TIGIT humano y de macaco cynomolgus (referido como cyno) y de las proteínas de ECD de PVR humanas.

Figura 52. Muestra el resumen de unión por citometría de flujo para fab anti-TIGIT. Todos los fabs positivos en ELISA únicos se analizaron por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se midió para las células Expi293 que sobreexpresaban TIGIT humano o de cyno, así como las células parentales Expi293. Se calculó la relación de MFI para la unión especifica de diana frente a no diana. Se muestran los datos para clones seleccionados.

La Figura 53A y B representan las secuencias de anticuerpos anti-TIGIT. A no ser que se indique otra cosa, las CDR utilizan la numeración IMGT (incluyendo los anticuerpos del listado de secuencias.

Figura 54. Muestra los resultados de KD por FACS de la unión de los mAb anti-TIGIT a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano como se describe en el Ejemplo 12.

Figura 55. Muestra los resultados de KD por FACS de la unión de los mAb a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT de cyno.

Figura 56. Muestra los resultados del Ejemplo 14, que muestran las constantes de velocidad cinética y las constantes de disociación en equilibrio resultantes, donde los datos fueron lo suficientemente fiables como para estimar las constantes de unión.

La Figura 57A a B muestran los resultados de la unión de la variante PVR-Fc humana a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano en el Ejemplo 4. Figura A (izquierda): Curva de unión generada para la construcción PVR humano-m2aFc titulada con células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano. Se muestran la KD y el intervalo de confianza al 95 %. Figura B (derecha): Curva de unión generada para la construcción PVR humano-h1Fc titulada con células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano. Se muestran la KD y el intervalo de confianza al 95 %.

Figura 58. Muestra una tabla de anticuerpos de fago que inhiben la unión de PVR humano-m2aFc a TIGIT humano sobreexpresado en células Expi293. Los mAb se ensayaron frente a un anticuerpo de referencia bloqueante conocido (BM26), y anticuerpo de control de isotipo de IgG4 humana (Synagis). Un "Sí" indica que el mAb inhibió hPVR de forma análoga a BM26.

Figura 59. Muestra una tabla de los valores de CI50 de anticuerpos de hibridoma anti-TIGIT que inhiben la unión de PVR humano-h1Fc a TIGIT humano sobreexpresado en células Expi293. Los valores son representativos de uno o dos experimentos independientes. Los resultados de IC50 para los dos experimentos realizados independientemente mostraron un rango de solo 1,2-2 veces de diferencia.

Figura 60. Muestra los resultados del Ejemplo 6, de que los anticuerpos derivados de fago y BM anti-TIGIT humano, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, BM26, y BM29 incrementan la señalización de IL-2. BM26 y BM29 son ambos del isotipo de IgG4 humana (hIgG4 con una variante S241P). Los datos representativos (n ≥ 2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células Jurkat IL-2-RE luciferasa con TIGIT humano y células aAPC CHO-K1 con PVR humano. La concentración de cada anticuerpo fue 10 µg/ml.

Figura 61. Muestra resultados adicionales del Ejemplo 6, de que los anticuerpos derivados de fago y BM hIgG4 anti-TIGIT humano, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, BM26, y BM29 incrementan la señalización de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. BM26 y BM29 son ambos del isotipo hIgG4. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células Jurkat IL-2-RE luciferasa con TIGIT humano y células aAPC CHO-K1 con PVR humano. Se usó para cada anticuerpo una serie de dilución de 2 veces de 10 puntos empezando en 20 µg/ml.

Figura 62. Muestra los resultados del Ejemplo 6, de que los anticuerpos derivados de hibridoma y BM anti-TIGIT humano, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26, y BM29 incrementan la señalización de IL-2. BM26 y BM29 son ambos del isotipo de mIgG1. El anticuerpo anti-TIGIT humano no bloqueante, CHA.9.543 no aumenta la señalización de IL-2. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células Jurkat IL-2-RE luciferasa con TIGIT humano y células aAPC CHO-K1 con PVR humano. La concentración de cada anticuerpo fue 10 µg/ml.

Figura 63. Muestra los resultados del Ejemplo 6, de que los anticuerpos derivados de hibridoma y de referencia mIgG1 anti-TIGIT humano, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, y BM26 incrementan la señalización de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. BM26 es del isotipo mIgG1. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células Jurkat IL-2-RE luciferasa con TIGIT humano y células aAPC CHO-K1 con PVR humano. Se usó para cada anticuerpo una serie de dilución de 2 veces de 10 puntos empezando en 20 µg/ml.

Figura 64. Muestra que los anticuerpos derivados de fago, hibridoma y BM anti-TIGIT humano, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26, y BM29 incrementan la señalización de IFNγ específica de antígeno. BM26 se ensaya tanto como el isotipo hIgG4 como mIgG1, mientras BM29 solo se ensaya como el isotipo hIgG4. Los datos representativos (n= 2) muestran la cantidad de IFNγ (media +/- desviación estándar) en el sobrenadante del cultivo después de 24 horas de cocultivo de células T $CD8^+$ específicas de CMV con las células Mel624 PVR humano. La concentración de cada anticuerpo fue 10 µg/ml. El Mel624 PVR humano usado en el ensayo se pulsó con 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml de péptido.

Figura 65. Muestra que los anticuerpos de fago, hibridoma y BM anti-TIGIT humano, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, y CHA.9.560, así como BM26, incrementan la señalización de IFNγ específica de antígeno bien solos (barras abiertas) o en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) (barras rayadas). BM26 es del isotipo mIgG1. Para los tratamientos con anticuerpo de control de isotipo, la barra abierta se refiere al anticuerpo de isotipo solo, y la barra rayada se refiere al anticuerpo de isotipo en combinación con CHA.7.518.1.H4(S241P). Los datos representativos (n=2) muestran la cantidad de IFNγ (media +/- desviación estándar) en el sobrenadante del cultivo después de un cocultivo de 24 horas de células T CD8+ específicas de CMV con las células Mel624 que sobreexpresan PVR humano y PVRL2 humano. La concentración de cada anticuerpo fue 10 µg/ml. Las células Me1624 PVR humano/PVRL2 humano usadas en el ensayo se pulsaron con 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml de péptido.

Figura 66. Muestra el porcentaje de incremento de la secreción de IFNγ con anticuerpos anti-TIGIT humano, CHA.7.518.1.H4(S241P), y la combinación de anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P), sobre los anticuerpos de control de isotipo respectivos.

La Figura 67 es el dendrograma para los experimentos de preclasificación de epítopos del Ejemplo 7.

La Figura 68 es el agrupamiento de los anticuerpos de los experimentos de preclasificación de epítopos del Ejemplo 7.

Figura 69. Muestra la unión de alta afinidad a células que sobreexpresan TIGIT humano en una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), anticuerpos de referencia (BM26, BM29), y el control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) en células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano, como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Todos los anticuerpos se titularon usando una dilución seriada de 2 veces en 11 puntos empezando en 10 µg/ml (133,33 nM [sitio de unión]). Se añadió anti-F(ab') humano de cabra marcado con AF647 (Jackson Immunoresearch) a las células para detectar la unión de los anticuerpos anti-TIGIT. Se muestran las gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT unidos a las

células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano (línea negra), y a las células parentales Expi293 (línea gris). Los valores de K_D +/- 95 % IC, y los ajustes de las curvas se indican debajo de cada gráfico.

Figura 70. Muestra que anticuerpos anti-TIGIT reaccionan de manera cruzada con TIGIT de cyno en una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), anticuerpos de referencia (BM26, BM29), y el control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) en células Expi293 que sobreexpresan TIGIT de cyno, como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Todos los anticuerpos se titularon usando una dilución seriada de 2 veces en 11 puntos empezando en 10 µg/ml (133,33 nM [sitio de unión]). Se añadió anti-F(ab') humano de cabra marcado con AF647 (Jackson Immunoresearch) a las células para detectar la unión de los anticuerpos anti-TIGIT. Se muestran las gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT unidos a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT de cyno (línea negra), y a las células parentales Expi293 (línea gris). Los valores de K_D +/- 95 % IC, y los ajustes de las curvas se indican debajo de cada gráfico.

Figura 71. Muestra que los anticuerpos de fago madurados por afinidad reaccionan de manera cruzada con TIGIT de ratón en una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad reformateados como IgG1 de ratón (mIgG1) (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de referencia anti-TIGIT de ratón (BM27 mIgG1, BM30 mIgG1), y el control de isotipo mIgG1 (anti-Synagis), se muestran, como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. A) La gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT unidos a las células HEK que sobreexpresan TIGIT de ratón (línea negra), y las células parentales HEK (línea gris). B) La gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT (línea negra) o Synagis mIgG1 (línea gris) unidos a células T CD4+CD25+Foxp3+ reguladoras aisladas de tumores Renca implantados s.c. en ratones Balb/c. Los anticuerpos anti-TIGIT se titularon bien usando una serie de diluciones seriadas de 2 o 3 veces empezando en 15 µg/ml (200 nM [sitio de unión]), o 10 µg/ml (132 nM [sitio de unión]), respectivamente. Se añadió anti-IgG-Fc de ratón de cabra marcado con AF647 (Southern Biotech) a las células para detectar la unión de los anticuerpos anti-TIGIT en células que sobreexpresan TIGIT de ratón. Los anticuerpos anti-TIGIT se conjugaron directamente a AF647 para la unión de Treg de ratón. Se indican los valores de K_D para cada anticuerpo anti-TIGIT.

Figura 72. Muestra una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) en células T CD95+CD28-CD8+CD3+ efectoras de memoria humanas de 3 donantes sanos de PBMC (Donantes 321, 322, y 334), como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Las PBMC se tiñeron en superficie con anticuerpos frente a los siguientes marcadores de linaje CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD28, CD56, y CD95 (BD Biosciences, BioLegend), así como tinción live/dead fixable aqua (Life Technologies). Los anticuerpos anti-TIGIT marcados con AF647 y anticuerpo de control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) se titularon entonces usando una dilución seriada de 3 veces de 12 puntos empezando en 30 µg/ml (396 nM [sitio de unión]). Se muestran las gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT unidos a las células T efectoras de memoria. Los valores de KD para cada anticuerpo en los 3 donantes diferentes se reportan en la tabla. Los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083 y CPA.9.086) tuvieron la afinidad de unión más alta a las células T efectoras de memoria humanas.

Figura 73. Muestra una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.103), anticuerpo de hibridoma humanizado (CHA.9.547.1), y anticuerpo de referencia (BM26) en células T $CD95^+CD28^-CD8^+CD3^+$ efectoras de memoria de cyno de PBMC aisladas de 2 monos cyno sin estimular (BioreclamationIVT), como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Las PBMC se tiñeron en superficie con anticuerpos frente a los siguientes marcadores de linaje CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD28, CD56, y CD95 (BD Biosciences, BioLegend), así como tinción live/dead fixable aqua (Life Technologies). Los anticuerpos anti-TIGIT marcados con AF647 y anticuerpo de control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) se titularon entonces usando una dilución seriada de 3 veces de 12 puntos empezando en 30 µg/ml (396 nM [sitio de unión]). Se muestran las gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT unidos a las células T efectoras de memoria con la gMFI del anticuerpo de control de isotipo anti-Synagis hIgG4 restada. Los valores de K_D para cada anticuerpo en los 2 donantes se reportan en la tabla. Los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083 y CPA.9.086) tuvieron la afinidad de unión más alta a las células T efectoras de memoria de cyno.

Figura 74. Muestra las cinéticas de SPR de la unión del anticuerpo anti-TIGIT a TIGIT humano, de cyno y de ratón, como se describe en los experimentos del Ejemplo 5. La velocidad cinética y las constantes de disociación en equilibrio para los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.103), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.1 y CHA.9.547.7), y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) se determinaron por SPR en el instrumento ProteOn.

Figura 75. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT bloquean las interacciones PVR/TIGIT, como se describe en los experimentos del Ejemplo 4. Se preincubaron células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano bien con los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), anticuerpos de referencia (BM26, BM29), o el control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis). Todos los anticuerpos se titularon usando una dilución seriada de 2,5 veces en 11 puntos empezando en 10 µg/ml (133,33 nM [sitio de unión]). Después de la preincubación del anticuerpo, se añadió PVR humano-m2aFc a las células a 158 nM [sitio de unión] o EC_{90}. Se añadió entonces anti-IgG-Fc de ratón de cabra marcado con AF647 (Southern Biotech) a las células para detectar la unión de anticuerpos anti-TIGIT. Se muestra el porcentaje de inhibición de la

unión de PVR-m2aFc a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano para cada anticuerpo. Los valores de CI_{50} para cada anticuerpo anti-TIGIT humano se reportan en la tabla (n=2 experimentos).

Figura 76. Muestra los resultados del Ejemplo 6, de que los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), y anticuerpo de referencia (BM26) incrementan la señalización de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. Synagis hIgG4 es el anticuerpo de control de isotipo. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células Jurkat IL-2-RE luciferasa con TIGIT humano y células CHO-K1 con PVR humano. Se usó para cada anticuerpo una serie de dilución de 1,5 veces de 19 puntos empezando en 20 µg/ml.

Figura 77. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT inducen IFNγ en células T CD8+ específicas de CMV. Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con células T CD8+ humanas específicas de CMV para evaluar el efecto de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) en la secreción de citoquinas específica de antígeno, como se describe en los experimentos del Ejemplo 6. La línea celular diana usada en el ensayo fue las células de adenocarcinoma pancreático HLA-A2+, Panc.05.04 que expresa de forma endógena PVR y PVRL2 humanos. Las células Panc.05.04 se pulsaron con el péptido pp65 de CMV a 0,03 µg/ml o 0,01 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron entonces y se sembraron en placas a 50.000 células/pocillo en placas tratadas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron los anticuerpos anti-TIGIT humano o el anticuerpo de control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) a una concentración de 0,1 µg/ml. Las células T CD8+ humanas específicas de CMV de un único donante se expandieron según el protocolo anterior. Se añadieron 50.000 células T CD8+ humanas a cada pocillo. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con CO2 al 5% durante 24 horas. La cantidad de interferón gamma (IFNγ) humano en el sobrenadante del cocultivo se midió por citometría de flujo usando un ensayo citométrico de lechos (BD Biosciences). El porcentaje de incremento de la secreción de IFNγ para cada anticuerpo sobre el isotipo hIgG4 se resume en la tabla (n=2 experimentos).

Figura 78. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT aumentan IFNγ cuando se combinan con un anticuerpo frente a PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P). Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con células T CD8+ humanas específicas de CMV para evaluar el efecto de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) en la secreción de citoquinas específica de antígeno en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG, CHA.7.518.1. La línea celular diana usada en este ensayo fue células de adenocarcinoma pancreático HLA-A2+, Panc.05.04 que expresan de forma endógena PVR y PVRL2 humanos. Las células Panc.05.04 se pulsaron con el péptido pp65 de CMV a 0,03 µg/ml o 0,01 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron entonces y se sembraron en placas a 50.000 células/pocillo en placas tratadas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron los anticuerpos anti-TIGIT humano o el anticuerpo de control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) a una concentración de 0,1 µg/ml en combinación con CHA.7.518.1 (barras rayadas) o un anticuerpo de control de isotipo hIgG4 a 10 µg/ml (barras sólidas). Las células T CD8+ humanas específicas de CMV de un único donante se expandieron según el protocolo anterior. Se añadieron 50.000 células T CD8+ humanas a cada pocillo. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con CO2 al 5% durante 24 horas. La cantidad de IFNγ humano en el sobrenadante del cocultivo se midió por citometría de flujo usando un ensayo citométrico de lechos (BD Biosciences). El porcentaje de incremento de la secreción de IFNγ para cada anticuerpo sobre el isotipo hIgG4 se resume en la tabla (n=2 experimentos).

Figura 79. Muestra el análisis de correlación de la expresión de PVRIG y TIGIT en células T CD4+ y CD8+ de tumores disociados. Para cada muestra de tumor, se calculó una relación de intensidad de fluorescencia media (MFIr), y se realizó un análisis de correlación de Spearman, y se reportó un valor r2 y p.

Figura 80. Muestra los resultados de la inhibición del crecimiento y supervivencia tumorales en ratones TIGIT KO tratados con un anticuerpo anti-PVRIG de ratón. Se inyectaron s.c. a grupos de 7-10 ratones TIGIT KO y C57BL/6 WT 1 x 10^5 células B16/Db-hmgp100. Los ratones se trataron dos veces por semana durante 3 semanas, empezando en el día de la inoculación (día 0) con el anticuerpo designado. A) Se muestran los volúmenes tumorales medios +/-error estándar de la media (SEM) en el gráfico superior, con *** indicando un valor p <0,001 para TIGIT KO tratados con anticuerpo anti-PVRIG de ratón (Clon 407) en comparación con C57BL/6 WT tratados con el anticuerpo de control de isotipo mIgG1. Los volúmenes tumorales para ratones individuales en cada grupo de tratamiento con anticuerpo se muestran como gráficos de araña en los gráficos inferiores. B) Tabla que resume la TGI según se mide en los días indicados en comparación con ratones control C57BL/6 WT tratados con el control de isotipo mIgG1. C) Supervivencia de los ratones después de la inyección s.c. de células B16/Db-hmgp100.

La Figura 81A a C representa tratamientos de combinación con los anticuerpos indicados en comparación con el control en células Mel-624, Colo205, y Panc.05.04. Se cocultivaron células T específicas de gp100 o CMVpp65 con células Mel-624, Colo205, y Panc.05.04, gp100 o péptido CMVpp65, y los anticuerpos indicados a 10 mg/ml. Se determinó la concentración de IFN-γ en el medio condicionado a las 24 hrs. Se muestra el Promedio + Desv Estd de triplicados. Se muestra el % de cambio en IFN-γ para cada condición respecto a hIgG4.

La Figura 82 A a C representan la expresión de PD-1/TIGIT/PVRIG en células T CD8 y la expresión de PD-L1, PVR, PVRL2 en células Colo205, Panc.05.04. A) Expresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1 en células T reactivas para CMVpp65 expandidas con el péptido pp65 con IL-2 e IL-7 durante 10 días. Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1 en

células T reactivas para CMVpp65. B) Se muestra la expresión de PD-L1, PVR, y PVRL2 en células Colo205 y Panc.05.04. C) Se cocultivaron células T específicas para CMVpp65 con células Colo205 y Panc.05.04, péptido CMVpp65, y los anticuerpos indicados a 10 mg/ml. Se determinó la concentración de IFN-γ en el medio condicionado a las 24 hrs. Se muestra el Promedio + Desv Estd de triplicados. Se muestra el % de cambio en IFN-γ para cada condición respecto a hIgG4.

Figura 83. PVRIG se expresa en su máximo nivel en subconjuntos de linfocitos citotóxicos de cáncer humano. A) Se muestra la expresión de PVRIG en subconjuntos de células de leucocitos de 5-8 donantes sanos de PBMC. La expresión de PVRIG se define como la relación de MFI de PVRIG respecto a la MFI del control de isotipo. B) Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, CD96, y PD-1 en Treg de sangre periférica en comparación con subconjuntos de células T CD8 de 5 donantes sanos de PBMC. C) Las células T específicas de pp65 de CMV de 3 donantes sanos se expandieron in vitro con péptido pp65 (495 - 503), IL-2 e IL-7 durante hasta 7 días. Se muestra la expresión de TIGIT (azul) y PVRIG (negro) en células positivas para el tetrámero HLA-A2/pp65 (495 - 503). D) Se cultivaron células T humanas con DC alogénicas y se muestra la expresión de TIGIT y PVRIG en células T $CD4^+$ en el día 0, 1, 2, y 7 después de la activación. E) Gráficos de FACS representativos que muestran la expresión de PVRIG (azul) en comparación con el control de isotipo (rojo) en TIL (células T CD4, células T CD8, y células NK) de un cáncer de pulmón y riñón representativo. F) Se muestra la coexpresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1 en TIL CD4 y CD8 de una muestra de cáncer de pulmón. G) Se muestra la expresión de PVRIG en TIL $CD8^+$ y $CD4^+$ de tumores humanos disociados de varios tipos de cáncer. Cada punto representa un tumor distinto de un paciente individual. H) Se evaluó la expresión relativa en TIL CD8 frente a TIL Treg para PVRIG, TIGIT, y PD-1 de tumores de endometrio, riñón, y pulmón. Para cada tumor, se normalizó las veces de expresión en TIL CD8 respecto a las veces de expresión en TIL Treg y se representó. Para A, B, C, G, y H, se muestra la media ± SEM por las barras de error.

Figura 84. La expresión de PVRL2 aumenta en el microentorno tumoral. A) Se evaluó la expresión de PVRL2 por IHC en tumores de pulmón, ovario/endometrio, mama, colon, riñón, y melanoma. Las barras representan la media ± SEM. Para cada tumor, se evaluaron 2 núcleos por un patólogo y se puntuaron sobre la base de la prevalencia e intensidad de la tinción membranosa en células tumorales como se describe en los métodos suplementarios. Para cada tumor, se muestra la puntuación promedio de 2 núcleos. B) Se muestra un tumor de melanoma representativo que muestra expresión de PVRL2 en las células tumorales (flecha) y en las células inmunes (*) en el estroma. C) Se muestra la expresión de PVRL2 en una escala log2 de tumores disociados determinada por FACS en TAM $CD45^-$, $CD14^+$, y subconjuntos de células mDC Lin^-CD14^- $CD33^{alto}$. Se muestra la media ± SEM para cada tipo de cáncer. La línea punteada representa que no se observó tinción. Para tipo de célula, se requirieron al menos 100 eventos con el fin de ser analizados. D) Se muestran gráficos de FACS representativos para la expresión de PVRL2 (azul) en comparación con IgG (rojo) para un cáncer de pulmón. E) Para las muestras de tumor en las que se pudo evaluar tanto la expresión de PVRIG como de PVRL2, la expresión de PVRIG en células T $CD8^+$ se representa frente a la expresión de PVRL2 en TAM $CD14^+$ y células $CD45^-$ para cada tumor. Cada punto representa una muestra de tumor individual. La línea roja representa una expresión de 2 veces de PVRIG o PVRL2 en comparación con IgG. La Tabla en la Figura 84F muestra la prevalencia de PVRL2 en varias muestras de tumor.

Figura 85. Distinta regulación de PVRL2 y PD-L1 en células tumorales. A) Se evaluó la expresión de PD-L1 y PVRL2 por IHC en secciones seriadas. Las muestras de tumores de la Figura 84 A se agruparon sobre la base del tipo de tejido y se muestra la expresión de PVRL2 en negativos para PD-L1 y positivos para PD-L1. Los tumores negativos para PD-L1 se definieron como sin tinción membranosa en células tumorales o inmunes de núcleos duplicados para un tumor dado. La tinción positiva para PD-L1 se definió como tinción membranosa en al menos 1 núcleo de un tumor. Las barras representan la media ± SEM para cada grupo. B, C) Expresión representativa de un tumor endometrial $PVRL2^+PD\text{-}L1^-$ (B) y un tumor de pulmón $PVRL2^+PD\text{-}L1^-$ (C). D) Se cultivaron BM-DC inmaduras con los estímulos indicados y se evaluó la expresión de PVR, PVRL2, y PD-L1 por FACS en el día 2 de cultivo. Para cada condición, la expresión se normalizó respecto a la condición de control solo con medio. E) Se muestra la expresión de PVR, PVRL2, y PD-L1 en células HT-29 tratadas con IFN-γ o medio solo. PD-L1 o PVRL2 se muestra en azul y la tinción del control de isotipo IgG se muestra en rojo.

Figura 86. CHA.7.518.1.H4(S241P) es un anticuerpo de alta afinidad que aumenta la activación de las células T. A) Se muestra la unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) o control de isotipo IgG a células HEK293 PVRIG o parentales HEK293 por FACS. Se muestran los valores de KD por FACS para la unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) a células HEK293 hPVRIG, HEK293 cPVRIG, y células Jurkat. B) CHA.7.518.1.H4(S241P) disrumpe la unión de PVRL2 Fc a las células HEK293 que expresan de forma ectópica PVRIG. Se muestra la Media ± Desv Estd de valores en triplicado. C) CHA.7.518.1.H4(S241P) bloquea la unión de PVRIG Fc a las células HEK293 que expresan de forma endógena PVRL2. D) Se cocultivaron células T CD4 humanas con células aAPC CHO que expresan un anticuerpo anti-CD3 unido a la superficie celular y hPVRL2 en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo anti-PVRIG y anticuerpos de control de isotipo de IgG humana. Se muestra el efecto del Ab anti-PVRIG en la proliferación de las células T CD4 aisladas de 11 donantes diferentes. Las barras representan la media ± SEM. E) Se cocultivaron líneas de células T específicas para gp100 (TIL-209, TIL-463) con células CHO preparadas por ingeniería para expresar HLA-A2 y PVRL2 junto con 10 µg/ml de anticuerpo anti-PVRIG o de control de isotipo IgG. Se ensayó la producción de IFN-γ y TNF-α a las 24 horas después del cocultivo. Se muestra la media ± Desv Estd de valores en triplicado. El porcentaje de cambio en IFN-γ y TNF-α para cada condición respecto al control de isotipo se representa por el número encima de cada barra F) Se muestra la expresión de PVR, PVRL2, y PD-L1 (rojo) respecto a IgG (blue) en células MEL624, Colo205, y Panc.05.04. Para las células T, se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1 (rojo) respecto a IgG (azul) en

células T TIL-209 y TIL-463 específicas para gp100, y en células T específicas para CMVpp65. Para expandir las células T reactivas para CMVpp65, se cultivaron PBMC con el péptido pp65 (495-503), IL-2, e IL-7 durante 10 días. Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, PD-1 en células positivas para el tetrámero HLA-A2/pp65. G) Se cocultivaron células T específicas para gp100 (TIL-209, TIL-463) expandidas a partir de TIL derivados de tumores de melanoma con células MEL624 en presencia de 10 µg/ml de los anticuerpos indicados. Se determinó la concentración de IFN-γ en el medio condicionado a las 24hrs. H, I) Se cocultivaron células T específicas para CMVpp65 expandidas con células Colo205 y Panc.05.04, péptido CMVpp65, y los anticuerpos indicados a 10 µg/ml. Se determinó la concentración de IFN-γ en el medio condicionado a las 24 hrs. Para E, G, H, I, se muestra el promedio ± Desv Estd de triplicados. El porcentaje de cambio en IFN-γ para cada condición respecto al control de isotipo se representa por el número encima de cada barra.

Figura 87. Los ratones deficientes en PVRIG tienen una función de las células T incrementada. A) Se evaluó la expresión de ARN de PVRIG según se mide por qRT-PCR de subconjuntos de células inmunes de ratón purificadas. Se determinó la expresión relativa respecto a la constitutiva por el método C_t. B) Se activaron células T transgénicas pmel $CD8^+$ TCR con gp100 (25-33) y loe niveles de transcritos de ARN de PVRIG y TIGIT se evaluaron por qRT-PCR a los puntos de tiempo indicados. El gráfico muestra la media ± SEM de resultados de 5 experimentos diferentes. C) Se recogieron los bazos de $PVRIG^{-/-}$ y compañeros de camada WT y se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de PVRIG en células NK, T $CD4^+$ y $CD8^+$ (células "En reposo"). Además, se aislaron células T $CD3^+$ de los esplenocitos y se activaron durante 11 días con lechos anti-CD3/anti-CD28. Después de la activación, se analizó la expresión de PVRIG en las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ (células "activadas") por citometría de flujo. Cada punto representa células derivadas de un ratón individual. D) Los esplenocitos derivados de WT y $PVRIG^{-/-}$ se marcaron con Tinción de Proliferación Celular eFluor450 y se cultivaron en presencia de Control-Fc (IgG2a de ratón) o con PVRL2 Fc de ratón. Después de 4 d de cultivo, se analizó la división celular por citometría de flujo. Se presentan los gráficos de FACS representativos de un experimento (izquierda) y el resumen del porcentaje de inhibición por PVRL2 Fc (definido como el % de proliferación de Control-Fc restado del % de proliferación de PVRL2 Fc) de 3 experimentos independientes (derecha). * indica valor $p < 0,05$, ensayo de la t de student emparejado para el cambio en la proliferación en presencia de PVRL2-FC respecto a la proliferación en presencia de proteína control en células T WT frente a $PVRIG^{-/-}$. E) Se activaron células T pmel $CD8^+$ derivadas de ratones pmel $PVRIG^{-/-}$ o pmel PVRIG WT durante 11 días con su péptido cognado e IL2. Las células pmel $CD8^+$ activadas se cocultivaron entonces con células B16-Db/gp100 durante 18 horas y después del cocultivo se evaluaron para determinar la expresión de CD107 y para determinar la producción de citoquinas. Se presentan cuatro experimentos independientes según se indica por cada punto emparejado. * indica valor $p < 0,05$, ensayo de la t de Student comparando $PVRIG^{-/-}$ frente a WT.

Figura 88. Resultados de la deficiencia de PVRIG en el crecimiento tumoral reducido y el mecanismo incrementado de células T efectoras CD8+. A) Se inyectaron subcutáneamente a ratones C57BL/6 WT o $PVRIG^{-/-}$ 5×10^5 células MC38. Se midieron los volúmenes tumorales x2 semanalmente. n= 10 ratones por grupo, se muestra el Promedio ± SEM, * Indica valor $p<0,05$ por el ensayo de la t de Student no emparejado para ratones WT frente a ratones $PVRIG^{-/-}$ (ANOVA). B) Se muestran curvas de crecimiento tumoral individuales. n=10 ratones por grupo, se muestra un experimento representativo (n=2). C) Se inyectaron subcutáneamente a ratones C57BL/6 WT o $PVRIG^{-/-}$ 5×10^5 células MC38. En el día 14 después de la inoculación, los ratones se trataron con anti-PD-L1, x2 semanalmente durante 2 semanas. Se midieron los volúmenes tumorales x2 semanalmente. n=10 ratones por grupo, se muestra el Promedio ± SEM, valor p= 0,052 por el ensayo de la t de Student no emparejado para ratones WT frente a ratones $PVRIG^{-/-}$, ambos tratados con anti-PD-L1. D) Se muestran curvas de crecimiento tumoral individuales. Se muestra un experimento representativo (n=2). E-H) En experimentos duplicados separados, los tumores se recogieron en el día 18 después de que los ratones hubieran recibido 2 dosis de anti-PD-L1 o el control de isotipo relevante. Los tumores disociados se enriquecieron para células $CD45^+$ antes de la estimulación durante 4 horas con PMA e Ionomicina en presencia de Brefeldina A. Los gráficos ilustran los números totales por mg de tejido tumoral de células inmunes $CD45^+$, células T $CD8^+$ y células T $CD8^+$ productoras de Interferón-γ de ratones tratados con isotipo de tipo salvaje y $PVRIG^{-/-}$ (E) y de ratones tratados con anti-PD-L1 de tipo salvaje y $PVRIG^{-/-}$ (F). G-H) Se muestra la frecuencia de células efectoras $CD8^+$ IFN-γ^+ TNF-α^+ en nódulos linfáticos de drenaje de tumor de ratones $PVRIG^{-/-}$ tratados con isotipo y anti-PD-L1, respecto a su cohorte de tipo salvaje correspondiente. Para E-H, se muestra el Promedio ± SEM y se muestran los valores p de un ensayo de la t de Student no emparejado.

Figura 89. Los anticuerpos antagonistas anti-PVRIG inhiben sinérgicamente el crecimiento tumoral en combinación con inhibidores de PD-1 o deficiencia genética de TIGIT. A) Se muestra la unión de la proteína de fusión mPVRL2 Fc a células preparadas por ingeniería mPVRIG HEK293 que se preincubaron con diluciones seriadas de mAb anti-mPVRIG o Ab de control de isotipo IgG. B) Se inyectaron subcutáneamente a ratones BALB/c 5×10^5 células CT26. En el día 14 después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se recogieron el bazo, nódulos linfáticos drenantes y tumores. Las células se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de PVRIG en células T $CD3^+CD4^+$, células T $CD3^+CD8^+$, células NK $CD3^-CD49b^+$, Células Supresoras Derivadas de Mieloide (MDSC) $CD11b^+$ Gr-1^+ y macrófagos $CD11b^+F4/80^+$. C,D) Se inyectaron subcutáneamente a ratones BALB/c 5×10^5 células CT26. En el día 7 después de la inoculación, los ratones se trataron con Ab anti-PD-L1 y/o anti-PVRIG, 2x semanalmente durante 3 semanas (las flechas indican el tratamiento con Ab). C) Se muestran los volúmenes tumorales. *** indica valor $p < 0,001$ (ANOVA) para aPD-L1+IgG2b de rata en comparación con los grupos tratados con PD-L1+aPVRIG. Las flechas indican cuándo se dosificaron los anticuerpos. D. Análisis de supervivencia de ratones respondedores completos. * indica valor $p < 0,05$ (Ensayo de rango logarítmico) para PD-L1 + IgG2b de rata en comparación con los grupos

tratados con PD-L1 + PVRIG. Se muestra un estudio representativo de 3 estudios. E. Se inyectaron subcutáneamente a ratones C57BL/6 o TIGIT$^{-/-}$ 1 x 10^5 células B16/Db-hmgp100. Los ratones se trataron 2x semanalmente durante 3 semanas con el mAb designado empezando el día de la inoculación (día 0). E. Se midieron los volúmenes tumorales 2x semanalmente y se muestra el promedio ± SEM. Inhibición del crecimiento tumoral según se mide en los días indicados en comparación con control WT+ control de isotipo mIgG1. *** indica valor p <0,001 para TIGIT$^{-/-}$ + aPVRIG en comparación con WT + control de isotipo mIgG1. Las flechas indican cuándo se dosificaron los anticuerpos. F. Se muestran curvas de crecimiento tumoral individuales para cada ratón. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados.

Figura 90. PVRIG se expresa en células T y NK de TILS en cáncer humano. A) Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, CD96, y PD-1 en subconjuntos de células T CD4 de PBMC de donantes sanos. Se muestra la media ± SEM. B) Se cocultivaron células T humanas con PBMC alogénicas y se muestra la expresión de la proteína PVRIG en células T CD4 y CD8 (parte superior). C) Los tumores se disociaron y se activaron células únicas con anti-CD3 y anti-CD28. La expresión de PVRIG (azul) respecto al control de isotipo IgG (rojo) se evaluó en el día 0 (directamente ex vivo) y en el día 5 después de la activación. D) Se muestra la expresión de PVRIG en células NK de tumores humanos disociados. Cada punto representa un tumor distinto de un paciente individual. Se muestra la media ± 95 % de intervalo de confianza. D) Las células tumorales disociadas se activaron con lechos de anti-CD3 y anti-CD28 durante 5 días. Se muestra la expresión de PVRIG (azul) respecto al control de IgG (rojo) en células T CD4 y CD8 en el día 0 directamente ex vivo y en el día 5 después de la activación para 2 muestras de tumor disociadas. E) La expresión de PVRIG se evaluó en células T CD4 y CD8 de tumores disociados y de tejido adyacente normal disociado concordante con el donante. Cada línea representa tejidos concordantes de un paciente individual. Se realizó un ensayo de la t de student emparejado. F) Se muestra un análisis de correlación de la magnitud de las veces de la expresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1 respecto al control de isotipo IgG en células T CD4 y CD8 de los tumores. Cada punto representa una muestra de tumor individual. Se muestran un coeficiente de correlación de Spearman y el valor p.

Figura 91. La expresión de PVRL2 está aumentada en los cánceres de colon, piel, y mama. A) Fotomicrografías que muestran la unión de anticuerpo Sigma anti-PVRL2 humano a secciones de FFPE de células positivas, CHO-S PVRL2 humano (derecha) en comparación con células negativas, CHO-S (izquierda), después de la recuperación del antígeno a pH9. B) Se ensayó el anticuerpo anti-PVRL2 en un panel de líneas celulares PVRL2$^+$ (HT29, MCF7, PC3, PANC1, RT4, NCI-H1573) y PVRL2$^-$ (Jurkat, OPM2, Daudi, CA46). C-F) Ejemplo de la expresión de PVRL2 en tejidos de pulmón normales y cancerosos. C) Tejido normal que no muestra tinción. D) Adenocarcinoma de pulmón que muestra tinción positiva parcial. E) Adenocarcinoma de pulmón que muestra tinción positiva. F) Adenocarcinoma de pulmón que muestra tinción positiva fuerte.

Figura 92. PVRL2 está regulado al alza en TAM y células CD45$^-$ en el tumor en comparación con el tejido adyacente normal. Se muestra la expresión de PVRL2 en células CD45$^-$ y TAM de tumor de donante concordante y tejido adyacente normal. Se muestra un valor p del ensayo de la t de student emparejado.

Figura 93. PVRIG y PVRL2 se coexpresan en la misma muestra de tumor. La expresión de PVRIG en células T CD4 (A) y células NK (B) se representa frente a la expresión de PVRL2 en TAM para un tumor individual.

Figura 94. Actividad de CHA.7.518.1.H4(S241P) en células T humanas. A) Expresión de PVRIG en células T CD4 activadas con células CHO que expresan anti-CD3 y PVRL2 unidos a la superficie celular. B) Se muestra la expresión de HLA-A2, B-2m, y PVRL2 en líneas celulares CHO-S parentales y CHO-S preparadas por ingeniería. Se representan las veces de expresión respecto al isotipo por el número. C) Se cocultivaron células CHO que expresan de forma ectópica anti-CD3 y PVRL2 unidos a la superficie celular con células T CD8 purificadas en presencia de varias concentraciones de Ab anti-PVRIG o control de IgG relevante. Se muestra el % de proliferación. Cada punto representa un promedio de valores en triplicado. D) Se cocultivaron células CHO que expresan de forma ectópica HLA-A2/B2m y PVRL2 con 2 líneas de células T específicas para gp100 (TIL F4, TIL 209) en presencia de 1 ug/ml de gp100 y varias concentraciones de anticuerpo anti-PVRIG o control de IgG relevante. Se muestran las concentraciones de TNF-α en el día 3 de cocultivo. Cada valor representa un promedio de triplicados.

Figura 95. Caracterización de las interacciones de unión de mPVRIG y un anticuerpo anti-mPVRIG sustituo. A, B) La unión de mPVRIG a mPVRL2 se evaluó por resonancia de plasmón superficial. C) Se incubaron el receptor de Fc soluble o proteínas control en una respuesta a la dosis con mPVRL2 HIS inmovilizado en un formato de ELISA. Se muestra el receptor de Fc unido. D) Se incubó la proteína PVRL2 HIS soluble en una respuesta a la dosis con placas recubiertas de PVRIG Fc o DNAM Fc. E) Se muestra la unión de mPVRIG Fc o proteína de fusión de Fc control a la línea celular B16-F10 transfectada con ARNsi de mPVRL2, mPVRsRNA, o transfección con ARNsi de secuencia aleatoria. F) La caracterización de la afinidad de mAb de rata anti-PVRIG de ratón se realizó examinando la unión de anti-mPVRIG a células HEK293 que sobreexpresan mPVRIG. G) Se muestra la caracterización de la afinidad de mAb de rata anti-PVRIG de ratón se realizó examinando la unión de anti-mPVRIG a la línea celular D10.G4.1 que expresa de forma endógena mPVRIG frente al control de isotipo IgG de rata. H) Unión de anti-mPVRIG a células D 10.G4.1 transfectadas con ARNsi de PVRIG de ratón (histograma verde) frente a ARNsi scr (histograma naranja). I) Unión de mPVRIG Fc preincubado con Ab anti-mPVRIG a células B16-F10, que expresan de forma endógena PVRL2.

Figura 96. Generación de ratones transgénicos con inactivación de PVRIG y TIGIT. Las líneas de ratones con inactivación condicional de PVRIG e inactivación de Tigit fueron generadas por Ozgene Pty Ltd (Bentley WA,

Australia). A) La construcción de direccionamiento en la que los exones de PVRIG 1 a 4 fueron flanqueados por sitios loxP se electroporó en una línea celular C57BL/6 ES, Bruce4 (Koentgen et al., Int Immunol 5: 957-964, 1993). B). La construcción de direccionamiento en la que la región codificadora del exón 1 de Tigit (incluyendo el ATG) y los exones 2 y 3 fueron reemplazados con un casete neo flanqueado por FRT se electroporó en una línea celular C57BL/6 ES, Bruce4. Se identificaron los clones celulares ES recombinantes homólogos por hibridación Southern y se inyectaron en blastocitos goGermline (Koentgen et al., genesis 54: 326-333, 2016). Se obtuvieron ratones quiméricos machos y se cruzaron con hembras C57BL/6J para establecer una descendencia de línea germinal heterocigota en un fondo C57BL/6. Los ratones de la línea germinal se cruzaron con una línea de ratón ubicua FLP C57BL/6 para eliminar el casete marcador seleccionable flanqueado por FRT y generar los alelos condicionales o inactivados (para PVRIG y Tigit, respectivamente). Para la inactivación de PVRIG, los ratones se cruzaron además con una línea de ratón ubicua Cre C57BL/6 para eliminar los exones flanqueados por loxP y generar el alelo inactivado.

Figura 97. Los ratones con PVRIG inactivado son inmuno-fenotípicamente similares a los ratones de tipo salvaje. Los ratones (n= 5 por cohorte de tipo salvaje y con PVRIG inactivado) se sometieron a eutanasia antes de la recogida de la sangre venosa en tubos recubiertos con anticoagulante y de la recogida de órganos. Se recuperaron células únicas de médula ósea, timo, bazo, nódulos linfáticos cutáneos y mesentéricos recién recogidos. Las células se tiñeron con anticuerpos marcadores de la superficie conjugados con fluorocromo y se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSR Fortessa. Los paneles ilustran frecuencias comparables de células mieloides (A), células dendríticas (B), células B (C), células T (D), células T CD4 (E), células T CD8 (F), y células NK (G) en los tipos de tejido linfoide. (H-I) Se opera sangre venosa completa en un sistema de hematología veterinaria Hemavet 950 para comparar recuentos diferenciales y frecuencias de subconjuntos de células sanguíneas de ratones de tipo salvaje y deficientes para PVRIG.

Figura 98. Función efectora incrementada de las células T en ratones PVRIG$^{-/-}$ tratados con anti-PDL1 en comparación con WT con anti-PD-L1. Se inocularon tumores MC38 en ratones WT o PVRIG$^{-/-}$ y se trataron posteriormente con anti-PD-L1 o control de isotipo de IgG2b de rata. En el día 18, se purificaron linfocitos CD45+ infiltrantes en el tumor de los tumores, se extrajo el ARN, y se realizó el perfilado de los transcritos. Se muestran varios genes relacionados con las células T, con cada punto representando un ratón individual. Se muestran los valores p del ensayo de la t de Student.

Figura 99. Los anticuerpos anti-TIGIT y anti-PVRIG inducen la muerte de las células tumorales. Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con células T CD8+ humanas específicas de CMV expandidas para evaluar el efecto del anticuerpo de referencia anti-TIGIT y CHA.7.518.1.H4(S241P) en la muerte de las células tumorales específica de antígeno. Las líneas celulares HLA-A2+ diana usadas en el ensayo fueron Mel624 (A) y Panc05.04 (B). Synagis hIgG4 es el anticuerpo de control de isotipo. La actividad luciferasa en las células diana se midió con el sustrato de luciferasa Bio-Glo. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de muerte específica (media +/- desviación estándar) de células Mel624 o Panc05.04 después de un cocultivo de 16 horas con células T CD8+ humanas específicas de CMV de tres donantes diferentes.

Figura 100. Muerte de células tumorales dependiente de la dosis de anticuerpos anti-TIGIT con CHA.7.518.1.H4(S241P). Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con células T CD8+ humanas específicas de CMV para evaluar el efecto de dos anticuerpos diferentes anti-TIGIT, BM26 y CPA.9.086 cuando se combinaron con CHA.7.518.1.H4(S241P) en la muerte de células Mel624 específica de antígeno. La actividad luciferasa en las células diana se midió con el sustrato de luciferasa Bio-Glo. Los datos representativos (n ≥ 2) muestran el porcentaje de muerte específica (media +/- desviación estándar) de células Mel624 después de un cocultivo de 16 horas con células T CD8+ humanas específicas de CMV de un donante.

Figura 101. Secuencias de CDR de CPA.9.086, numeración IMGT y de Kabat.

Figura 102. La combinación de hIgG4 anti-TIGIT + CHA.7.518.1.H4(S241P) induce la muerte de las células tumorales. El cocultivo de células T CD8+ reactivas para CMV con Mel624 PVR, PVRL2 y luciferasa OE Única dosis de 10 µg/ml de Ab aTIGIT y 10 µg/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) con donante 4 reactivo para CMV, mientras la titulación de la dosis empezó en 0,5 µg/ml de Ab aTIGIT y 10 µg/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) con el donante 156 reactivo para CMV.

V. Descripción detallada de la invención

A. Visión global

La presente descripción proporciona varios anticuerpos útiles, para su uso solos o en combinación, para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede considerarse como una incapacidad del paciente de reconocer y eliminar las células cancerosas. En muchos casos, estas células trasformadas (p. ej., cancerosas) contrarrestan la vigilancia inmune. Existen mecanismos de control naturales que limitan la activación de las células T en el cuerpo para prevenir la actividad no restringida de las células T, que pueden ser explotados por las células cancerosas para escapar de o suprimir la respuesta inmune. La restauración de la capacidad de las células efectoras inmunes-especialmente las células T-para reconocer y eliminar el cáncer es el objetivo de la inmunoterapia. El campo de la inmuno-oncología, algunas veces referida como "inmunoterapia" se está desarrollando rápidamente, con varias aprobaciones recientes de anticuerpos inhibidores del punto de control de las células T tales como Yervoy, Keytruda y Opdivo. Estos anticuerpos se refieren generalmente como "inhibidores del punto de control" porque bloquean normalmente los

reguladores negativos de la inmunidad de las células T. Se entiende generalmente que puede usarse una variedad de señales inmunomoduladoras, tanto coestimuladoras como coinhibidoras, para orquestar una respuesta inmune específica de antígeno óptima. Generalmente, estos anticuerpos se unen a proteínas inhibidoras del punto de control tales como CTLA-4 o PD-1, las cuales, en circunstancias normales, previenen o suprimen la activación de las células T citotóxicas (CTL). Mediante la inhibición de la proteína del punto de control, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos que se unen a estas proteínas, puede conseguirse una respuesta de células T incrementada frente a los tumores. Es decir, estas proteínas del punto de control del cáncer suprimen la respuesta inmune; cuando las proteínas se bloquean, por ejemplo, usando anticuerpos frente a la proteína del punto de control, se activa el sistema inmune, dando lugar a la estimulación inmune, dando lugar al tratamiento de afecciones tales como el cáncer y enfermedades infecciosas.

La presente invención está dirigida al uso de anticuerpos frente a proteínas del punto de control adicionales, PVRIG y TIGIT. PVRIG se expresa en la superficie celular de las células NK y T-y comparte varias similitudes con otros puntos de control inmunes conocidos. La identificación y los métodos usados para mostrar que PVRIG es un receptor de punto de control se discuten en WO2016/134333. En la presente memoria se proporcionan anticuerpos frente a PVRIG humano que bloquean la interacción y/o unión de PVLR2. Cuando PVRIG se une a su ligando (PVRL2), se incita una señal inhibidora que actúa para atenuar la respuesta inmune de las células NK y T frente a una célula diana (es decir, análoga a PD-1/PDL1). El bloqueo de la unión de PVRL2 a PVRIG apaga esta señal inhibidora de PVRIG y como resultado modula la respuesta inmune de las células NK y T. La utilización de un anticuerpo frente a PVRIG que bloquee la unión a PVRL2 es una estrategia terapéutica que aumenta la muerte de las células cancerosas por las células NK y T. Se han generado anticuerpos bloqueantes que se unen a PVRIG y bloquean la unión de su ligando, PVRL2. Se proporcionan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con otros anticuerpos inhibidores del punto de control, tal como PD-1.

De forma similar, se ha mostrado que TIGIT también tiene atributos de un receptor del punto de control, y la presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que bloquean la interacción y/o unión de TIGIT a PVR se proporcionan. Cuando TIGIT se une a su ligando (PVR), se incita una señal inhibidora que actúa para atenuar la respuesta inmune de las células NK y T frente a una célula diana (es decir, análoga a PD-1/PDL1). El bloqueo de la unión de PVR a TIGIT apaga esta señal inhibidora de TIGIT y como resultado modula la respuesta inmune de las células NK y T. La utilización de un anticuerpo frente a TIGIT que bloquee la unión a PVR es una estrategia terapéutica que aumenta la muerte de las células cancerosas por las células NK y T. Se han generado anticuerpos bloqueantes que se unen a TIGIT y bloquean la unión de su ligando, PVR. Se proporcionan anticuerpos anti-TIGIT en combinación con otros anticuerpos inhibidores del punto de control, tal como PD-1.

Adicionalmente, la invención proporciona combinaciones de anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT para su uso en el tratamiento del cáncer.

B. Definiciones

Con el fin de que la solicitud se comprenda más completamente, se muestran a continuación varias definiciones. Se pretende que dichas definiciones engloben los equivalentes gramaticales.

Por "ablación" se quiere decir en la presente memoria una disminución o eliminación de actividad. En algunas realizaciones, es útil eliminar la actividad de los dominios constantes de los anticuerpos. Así, por ejemplo, "ablación de la unión de FcγR" significa que la variante de aminoácidos de la región Fc tiene menos del 50 % de la unión de partida en comparación con una región Fc que no contiene la variante específica, siendo preferido menos del 70-80-90-95-98 % de pérdida de actividad, y, in general, estando la actividad por debajo del nivel de la unión detectable en un ensayo Biacore. Como se muestra en la Figura 50, una variante de ablación en la región constante de IgG1 es la variante N297A, que elimina el sitio de glicosilación nativo y reduce significativamente la unión de FcγRIIIa y así, reduce la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

Por "dominio de unión a antígeno" o "ABD" se quiere decir en la presente memoria un conjunto de seis Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) que, cuando está presente como parte de una secuencia de polipéptido, se une específicamente a un antígeno diana como se discute en la presente memoria. Así, un "dominio de unión a antígeno TIGIT" se une al antígeno TIGIT (cuya secuencia se muestra en la Figura 51) como se indica en la presente memoria. De forma similar, un "dominio de unión al antígeno PVRIG" se une al antígeno PVRIG (cuya secuencia se muestra en la Figura 1) como se indica en la presente memoria. Como se sabe en la técnica, estas CDR están presentes generalmente como un primer conjunto de CDR pesadas variables (vhCDR o V_HCDR) y un segundo conjunto de CDR ligeras variables (vlCDR o V_LCDR), comprendiendo cada una tres CDR: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 para la cadena pesada y vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 para la ligera. Las CDR están presentes en los dominios pesado variable y ligero variable, respectivamente, y conjuntamente forman una región Fv. Así, en algunos casos, las seis CDR del dominio de unión a antígeno están aportadas por una cadena pesada variable y ligera variable. En un formato "Fab", el conjunto de las 6 CDR están aportadas por dos secuencias de polipéptido diferentes, el dominio pesado variable (vh o V_H; que contiene vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y el dominio ligero variable (vl o V_L; que contiene vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3), estando unido el extremo C del dominio vh al extremo N del dominio CH1 de la cadena pesada y estando unido el extremo C del dominio vl al extremo N del dominio ligero constante (y formando así la cadena ligera).

Por "modificación" se quiere decir en la presente memoria una sustitución, inserción, y/o deleción de aminoácidos en una secuencia de polipéptido o una alteración en un resto unido químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser un carbohidrato alterado o una estructura de PEG unida a una proteína. Por "modificación de aminoácidos" se quiere decir en la presente memoria una sustitución, inserción, y/o deleción de aminoácidos en una secuencia de polipéptido. Por razones de claridad, a no ser que se indique otra cosa, la modificación de aminoácidos está siempre en un aminoácido codificado por ADN, p. ej., los 20 aminoácidos que tienen codones en ADN y ARN.

Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" se quiere decir en la presente memoria el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental con un aminoácido diferente. En particular, en algunas realizaciones, la sustitución es con un aminoácido que no es natural en la posición particular, bien no natural en el organismo o en ningún organismo. Por ejemplo, la sustitución N297A se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en el que la asparagina en la posición 297 se reemplaza con alanina. Por razones de claridad, una proteína que se ha preparado por ingeniería para cambiar la secuencia codificadora de ácido nucleico, pero no cambiar el aminoácido de partida (por ejemplo, intercambiar CGG (que codifica arginina) por CGA (que todavía codifica arginina) para incrementar los niveles de expresión en el organismo huésped) no es una "sustitución de aminoácidos"; esto es, a pesar de la creación de un nuevo gene que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular con la empezó, no es una sustitución de aminoácidos.

Por "inserción de aminoácidos" o "inserción", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, -233E o 233E designa una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Adicionalmente, -233ADE o A233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

Por "deleción de aminoácidos" o "deleción", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir la eliminación de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, E233- o E233#, E233() o E233del designa una deleción de ácido glutámico en la posición 233. Adicionalmente, EDA233- o EDA233# designa una deleción de la secuencia GluAspAla que empieza en la posición 233.

Por "proteína variante" o "variante de proteína", o "variante", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una proteína que se diferencia de una proteína parental gracias al menos a una modificación de aminoácidos. La variante de proteína se puede referir a la proteína en sí misma, a una composición que comprende la proteína, o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Preferiblemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la proteína parental, p. ej., de aproximadamente una a aproximadamente setenta modificaciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la parental. Como se describe más adelante, en algunas realizaciones, el polipéptido parental, por ejemplo, un polipéptido Fc parental, es una secuencia de tipo salvaje humana, tal como la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, aunque también pueden servir secuencias humanas con variantes como "polipéptidos parentales". La secuencia de la variante de proteína en la presente memoria poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % de identidad con una secuencia de proteína parental, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95-98-99 % de identidad. La proteína variante también se refiere a la proteína variante en sí misma, a composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica. Por consiguiente, por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir un anticuerpo que se diferencia de un anticuerpo parental gracias al menos a una modificación de aminoácidos, "variante de IgG" o "IgG variante", tal y como se usa en la presente memoria, quiere decir un anticuerpo que se diferencia de una IgG parental (de nuevo, en muchos casos, de una secuencia de IgG humana) gracias al menos a una modificación de aminoácidos, y "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", tal y como se usa en la presente memoria, quiere decir una secuencia de inmunoglobulina que se diferencia de la de una secuencia de inmunoglobulina parental gracias al menos a una modificación de aminoácidos. "Variante de Fc" o "Fc variante", tal y como se usa en la presente memoria, quiere decir una proteína que comprende una modificación de aminoácidos en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, S241P o S228P es una variante de bisagra con la sustitución prolina en la posición 228 respecto al polipéptido bisagra de IgG4 parental, en donde la numeración S228P es según el índice EU y la S241P es la numeración de Kabat. El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, incorporado por completo por la presente por referencia). La modificación puede ser una adición, deleción, o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y, en algunos casos, aminoácidos sintéticos. Los ejemplos incluyen la Pat. de EE. UU. No. 6.586.207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, y P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS United States of America 99: 11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10.

Tal y como se usa en la presente memoria, "proteína" quiere decir en la presente memoria al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. El grupo peptidilo puede comprender aminoácidos naturales y enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir "análogos", tales como peptoides (véase, Simon et al., PNAS USA 89(20):9367 (1992)). Los aminoácidos pueden ser

bien naturales o sintéticos (p. ej., un aminoácido que no está codificado por ADN); como apreciarán los expertos en la técnica. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina se consideran aminoácidos sintéticos para los propósitos de la invención, y pueden utilizarse los aminoácidos tanto en configuración D como L (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos sintéticos incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colaboradores, incluyendo, pero no limitado a, los métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7. Además, los polipéptidos pueden incluir la derivatización sintética de una o más cadenas laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclación, conectores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios de proteínas, y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

Por "residuo", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una posición en una proteína y su identidad de aminoácidos asociada. Por ejemplo, la Asparagina 297 (también referida como Asn297 o N297) es un residuo en la posición 297 en el anticuerpo IgG1 humano.

Por "Fab" o "región Fab", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL, y CL. Fab puede referirse a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un único anticuerpo. Como apreciarán los expertos en la técnica, estos están compuestos generalmente de dos cadenas.

Por "Fv de cadena única" o "scFv" se quiere decir en la presente memoria un dominio pesado variable unido covalentemente a un dominio ligero variable, usando generalmente un conector scFv como se discute en la presente memoria, para formar un scFv o dominio de scFv. Un dominio de scFv puede estar en cualquier orientación desde el extremo N al C (vh-conectpr-vl o vl-conector-vh). En general, el conector es un conector scFv como se conoce generalmente en la técnica, con el péptido conector incluyendo predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido conector debe tener una longitud que sea adecuada para conectar dos moléculas de una manera tal que asuman la conformación correcta una respecto a la otra de manera que retengan la actividad deseada. En una realización, el conector tiene una longitud de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos, preferiblemente una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos. En una realización, pueden usarse los conectores con una longitud de 1 a 20 aminoácidos, encontrando uso en algunas realizaciones los que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos. Los conectores útiles incluyen polímeros de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS)n, (GSGGS)n, (GGGGS)n, y (GGGS)n, donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros conectores flexibles. Alternativamente, puede encontrar uso como conectores una variedad de polímeros no proteináceos, incluyendo, pero no limitado a, polietilen glicol (PEG), polipropilen glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilen glicol y polipropilen glicol, esto es, pueden encontrar uso como conectores.

Por "modificación de subclase de IgG" o "modificación de isotipo", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo de IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG diferente alineado. Por ejemplo, como IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase de IgG. De forma similar, como IgG1 tiene una prolina en la posición 241 e IgG4 tiene una serina ahí, una molécula de IgG4 con una S241P se considera una modificación de subclase de IgG. Obsérvese que dichas modificaciones de subclase se consideran sustituciones de aminoácidos en la presente memoria.

Por "modificación no natural", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una modificación de aminoácidos que no es isotípica. Por ejemplo, como ninguna de las IgG comprende AN asparagina en la posición 297, la sustitución N297A en IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 (o híbridos de las mismas) se considera una modificación no natural.

Por "aminoácido" e "identidad de aminoácidos", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir uno de los 20 aminoácidos naturales que están codificados por ADN y ARN.

Por "función efectora", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no están limitadas a, ADCC, ADCP, y CDC.

Por "ligando de Fc de IgG", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo, que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de Fc/ligando de Fc. Los ligandos de Fc incluyen, pero no están limitados a, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilococal, proteína G estreptococal, y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcγR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Los ligandos de Fc de IgG particulares son FcRn y receptores gamma de Fc. Por "ligando de Fc", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una molécula, preferiblemente un

polipéptido, de cualquier organismo, que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc/ligando de Fc.

Por "polipéptido parental", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir un polipéptido de partida que se modifica posteriormente para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión preparada por ingeniería de un polipéptido natural. El polipéptido parental puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "inmunoglobulina parental", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo parental", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir un anticuerpo no modificado que se modifica para genera un anticuerpo variante. Debe indicarse que "anticuerpo parental" incluye anticuerpos comerciales conocidos, producidos de forma recombinante, como se indica más adelante.

Por "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo, excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Así, Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD, e IgG, los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y el extremo N de la bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cγ2 y Cγ3 (Cγ2 y Cγ3) y la región de bisagra inferior entre Cγ1 (Cγ1) y Cγ2 (Cγ2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para incluir los residuos C226 o P230 en su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, como se describe más completamente más adelante, se hacen modificaciones de aminoácidos en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn.

Por "región constante pesada" se quiere decir en la presente memoria la parte CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

Por "posición", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo, el índice EU para la numeración de anticuerpos.

Por "antígeno diana", tal y como se usa en la presente memoria. se quiere decir la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. En el presente caso, un antígeno diana de interés en la presente memoria es TIGIT, habitualmente TIGIT humano y, opcionalmente, TIGIT de cyno, como se define más adelante. Otro antígeno diana de interés es PVRIG, habitualmente PVRIG humano y, opcionalmente, PVRIG de cyno, como se define más adelante.

Por "célula diana", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir una célula que expresa un antígeno diana.

Por "región variable", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes de Vκ (V.kappa), Vλ (V.lamda), y/o VH que componen los loci genéticos de capas kappa, lambda, y pesada de inmunoglobulina, respectivamente.

Por "de tipo salvaje o WT" se quiere decir en la presente memoria una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo las variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.

Los anticuerpos de la presente invención están generalmente aislados o son recombinantes. "Aislado", cuando se usa para describir los diferentes polipéptidos descritos en la presente memoria, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular en el que se expresa. Ordinariamente, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. "Recombinante" significa que los anticuerpos se generan usando técnicas de ácidos nucleicos recombinantes en células huésped exógenas.

"Unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un antígeno o un epítopo particular, significa una unión que es diferente de forma mensurable de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula control, que es generalmente una molécula con una estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por la competición con una molécula control que es similar a la diana.

La unión específica para un antígeno o un epítopo particular puede presentarla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítopo de al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, al menos aproximadamente 10^{-13} M, al menos aproximadamente 10^{-14} M, al menos aproximadamente 10^{-15} M, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una

interacción particular de anticuerpo-antígeno. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 veces o más mayor para una molécula control respecto al antígeno o epítopo.

También, la unión específica para un antígeno o un epítopo particular puede presentarla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítopo de al menos 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 veces o más mayor para el epítopo respecto a un control, donde KA o Ka se refiere a una tasa de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. La afinidad de unión se mide generalmente usando resonancia de plasmón superficial (p. ej., ensayo Biacore) y citometría de flujo con células que expresan el antígeno.

C. Secuencias

El listado de secuencias proporciona varias secuencias sobre la base del Formato de la Figura 53; se hace referencia a la Figura 4 de USSN 62/513.916 como una guía para el marcaje de las secuencias. El dominio pesado variable se marca con el identificador (p. ej., "CPA.0.86"), siguiendo la siguiente secuencia el formato de la Figura 53 de la presente memoria descriptiva (idéntico al formato de la Figura 4, referenciado anteriormente), en que el identificador de la siguiente secuencia es al vhCDR1, el siguiente a vhCDR2, con vhCDR3, la cadena pesada de longitud completa, el dominio ligero variable, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3 y la cadena ligera de longitud completa. Así, un anticuerpo individual tiene 10 identificadores de secuencia asociados. En el listado de secuencias se incluyen las secuencias de IgG1 de ratón BM26 (BM26-M1) (WO2016/028656A1, Clon 31C6) e IgG1 de ratón BM29 (BM29-M1) (US2016/0176963 A1, Clon 22G2). A no ser que se indique, las secuencias de HC de longitud completa de los anticuerpos frente a TIGIT están el formato H4(S241P).

D. Proteínas PVRIG

La presente descripción proporciona anticuerpos que se unen específicamente a proteínas PVRIG y previenen la activación por su proteína ligando, PVRL2, una glicoproteína de la membrana plasmática humana. PVRIG, también denominada Proteína que Contiene el Dominio de Inmunoglobulina Relacionado con el Receptor de Poliovirus, Q6DKI7 o C7orf15, se refiere a las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico mostradas en RefSeq con el identificador de acceso NP_076975, mostrado en la Figura 1. La secuencia de la proteína relacionada con el receptor de poliovirus humano 2 (PVLR2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador de la entrada de herpesvirus B, (HVEB)), el compañero de unión de PVRIG (como se muestra en el Ejemplo 5 de la Publicación de EE. UU. 2016/0244521), se muestra en la Figura 2. Los anticuerpos de la invención son específicos para el dominio extracelular de PVRIG de manera que se bloquea la unión de PVRIG y PVLR2.

PVRIG es una proteína con dominio transmembrana de 326 aminoácidos de longitud, con un péptido señal (que abarca desde el aminoácido 1 al 40), un dominio extracelular (que abarca desde el aminoácido 41 al 171), un dominio transmembrana (que abarca desde el aminoácido 172 al 190) y un dominio citoplásmico (que abarca desde el aminoácido 191 al 326). Hay dos metioninas que pueden ser codones de inicio, pero las proteínas maduras son idénticas.

Por consiguiente, tal y como se usa en la presente memoria, el término "PVRIG" o "proteína PVRIG" o "polipéptido PVRIG" puede incluir opcionalmente cualquiera de dichas proteínas, o variantes, conjugados, o fragmentos de las mismas, incluyendo, pero no limitado a, PVRIG conocida o de tipo salvaje, como se describe en la presente memoria, así como cualesquiera variantes de corte y empalme naturales, variantes o isoformas de aminoácidos, y, en particular, el fragmento de ECD de PVRIG.

Como se indica en la presente memoria y se describe más completamente más adelante, los anticuerpos anti-PVRIG (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) que se unen a PVRIG y previenen la activación por PVRL2 (p. ej., lo más comúnmente bloqueando la interacción de PVRIG y PVLR2), se usan para aumentar la activación de las células T y/o células NK y se usan para tratar enfermedades tales como el cáncer y la infección por patógenos.

E. Proteínas TIGIT

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a proteínas TIGIT y previenen la activación por su proteína ligando, PVR, receptor de poliovirus (también conocido como CD155), una glicoproteína de la membrana plasmática humana. TIGIT, o inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM, es una proteína receptora co-inhibidora también conocida como WUCAM, Vstm3 o Vsig9. TIGIT tiene un dominio variable de inmunoglobulina, un dominio transmembrana, y inmunorreceptor basado en un resto inhibidor rico en tirosina (ITIM) y contiene elementos de secuencia signature de la familia de las proteínas PVR. Las secuencias del dominio extracelular (ECD) de TIGIT y de PVR se muestran en la Figura 51. Los anticuerpos de la invención son específicos para el ECD de TIGIT de manera que se bloquea la unión de TIGIT y PVR.

Por consiguiente, tal y como se usa en la presente memoria, el término "TIGIT" o "proteína TIGIT" o "polipéptido TIGIT" puede incluir opcionalmente cualquiera de dichas proteínas, o variantes, conjugados, o fragmentos de las mismas, incluyendo, pero no limitado a, TIGIT conocida o de tipo salvaje, como se describe en la presente memoria, así como cualesquiera variantes de corte y empalme naturales, variantes o isoformas de aminoácidos, y, en particular, el fragmento de ECD de TIGIT.

Como se indica en la presente memoria y se describe más completamente más adelante, los anticuerpos anti-TIGIT (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) que se unen a TIGIT y previenen la activación por PVR (p. ej., lo más comúnmente bloqueando la interacción de TIGIT y PVR), se usan para aumentar la activación de las células T y/o células NK y se usan para tratar enfermedades tales como el cáncer y la infección por patógenos.

VI. Anticuerpos

Como se discute más adelante, el término "anticuerpo" se usa generalmente. Las unidades estructurales de los anticuerpos tradicionales comprenden típicamente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. La presente invención está dirigida a anticuerpos monoclonales que se basan generalmente en la clase IgG, que tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitado a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En general, IgG1, IgG2 e IgG4 se usan más frecuentemente que IgG3. Debe indicarse que IgG1 tiene diferentes alotipos con polimorfismos en 356 (D o E) y 358 (L o M). Las secuencias representadas en la presente memoria usan el alotipo 356D/358M, sin embargo, el otro alotipo se incluye en la presente memoria. Esto es, cualquier secuencia que incluye un dominio Fc de IgG1 incluida en la presente memoria puede tener 356E/358L reemplazando el alotipo 356D/358M.

La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsable del reconocimiento del antígeno, generalmente referida en la técnica y en la presente memoria como el "dominio Fv" o "región Fv". En la región variable, tres bucles se reúnen para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se refiere como una región determinante de la complementariedad (referido de aquí en adelante en la presente memoria como una "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es muy significativa. "Variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de la región variable se diferencian extensamente en secuencia entre los anticuerpos. La variabilidad en la región variable no está distribuida uniformemente. En su lugar, las regiones V consisten en cadenas relativamente invariables denominadas regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una una longitud de 9-15 aminoácidos o mayor.

Cada VH y VL está compuesta por tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de la complementariedad", "CDR") y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR 1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 -CDR3 -FR4.

La región hipervariable engloba generalmente residuos de aminoácidos desde aproximadamente los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1; "L" indica cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y alrededor de aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un bucle hipervariable (p. ej., los residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Las CDR específicas de la invención se describen más adelante.

Como apreciarán los expertos en la técnica, la numeración y posicionamiento exacto de las CDR pueden ser diferentes entre diferentes sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la descripción de una secuencia pesada variable y/o ligera variable incluye la descripción de las CDR asociadas (inherentes). Por consiguiente, la descripción de cada región pesada variable es una descripción de las vhCDR (p. ej., vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la descripción de cada región ligera variable es una descripción de las vlCDR (p. ej., vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3). Una comparación útil de la numeración de las CDR es como se indica a continuación, véase Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

	Kabat+Clothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se usa generalmente el sistema de numeración de Kabat cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1-107 de la región variable de cadena ligera y los residuos 1-113 de la región variable de cadena pesada) y la bisagra y el sistema de numeración EU para las regiones Fc (p. ej., Kabat et al., *supra* (1991)).

La presente descripción proporciona un gran número de diferentes conjuntos de CDR. En este caso, un "conjunto de CDR completo" comprende las tres CDR ligeras variables y tres pesadas variables, p. ej., a vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden ser parte de un dominio ligero variable o pesado variable mayor, respectivamente. Además, como se indica más completamente en la presente memoria, los dominios pesados variables y ligeros variables pueden estar en cadenas de polipéptidos separadas, cuando se usa una cadena pesada y ligera, o en una única cadena de polipéptido en el caso de secuencias scFv.

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno o, más específicamente, el sitio de unión a epítopo de los anticuerpos. "Epítopo" se refiere a un determinante que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como un paratopo. Los epítopos son agrupaciones de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un único antígeno puede tener más de un epítopo.

El epítopo puede comprender residuos de aminoácidos implicados directamente en la unión (también denominado componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no están implicados directamente en la unión, tales como residuos de aminoácidos que se bloquean de manera efectiva por el péptido de unión a antígeno específico; en otras palabras, el residuo de aminoácido está en la cobertura del péptido de unión a antígeno específico.

Los epítopos pueden ser bien conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena de polipéptido lineal. Un epítopo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptido. Los epítopos conformacionales y no conformacionales pueden distinguirse porque la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Un epítopo incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, "preclasificación". Como se indica más adelante, la invención no solo incluye los dominios de unión a antígeno y anticuerpos enumerados en la presente memoria, sino aquellos que compiten para la unión con los epítopos unidos por los dominios de unión a antígeno enumerados.

La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante, responsable principalmente de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Sobre la base del grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en las CDR y el marco e hicieron una lista de las mismas (véase, SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edición, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., incorporado en su totalidad por referencia).

En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se quiere decir en la presente memoria una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. De interés en la presente invención son los dominios de cadena pesada, incluyendo, los dominios pesados constantes (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos de IgG

tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son como sigue: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 según el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 según el índice EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" se quiere decir en la presente memoria el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y el segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el residuo de la posición EU 237. Así, para IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente memoria para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat.

La cadena ligera comprende generalmente dos dominios, el dominio ligero variable (que contiene las CDR de cadena ligera y junto con los dominios pesados variables forma la región Fv), y una región de cadena ligera constante (referida frecuentemente como CL o Cκ). En general, puede usarse bien el dominio constante lambda o constante kappa, con lambda encontrando generalmente uso en la invención.

Otra región de interés para sustituciones adicionales, indicada más adelante, es la región Fc.

A. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En algunas realizaciones, los anticuerpos en la presente memoria pueden derivar de una mezcla de diferentes especies, p. ej., un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los "anticuerpos quiméricos" como los "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" comprenden tradicionalmente una o unas regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la o las regiones constantes de un ser humano. Los "anticuerpos humanizados" generalmente se refieren a anticuerpos no humanos a los que se han cambiado las regiones marco del dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto en sus CDR. Las CDR, algunas de las cuales o todas, están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco en lámina beta de una región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, p. ej., en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536. Se requiere frecuentemente la "Retromutación" de los residuos marco aceptores seleccionados a los residuos donantes correspondientes para volver a ganar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213). El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte, y habitualmente toda, de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y así, típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse usando ratones con un sistema inmune preparado por ingeniería genética. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. En la técnica se conoce bien una variedad de técnicas y métodos para humanizar y reestructuración anticuerpos no humanos (Véase, Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), y las referencias citadas en el mismo). Los métodos de humanización incluyen, pero no están limitados a, los métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321 :522-525; Riechmann et al.,1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239: 1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86: 10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de modificación en superficie, como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973.

Así, las vhCDR y vlCDR de cualquiera de los anticuerpos enumerados en la presente memoria pueden humanizarse (o "rehumanizarse", para aquellas que ya se habían humanizado).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la descripción comprenden una región variable de cadena pesada de un gen de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal particular. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden comprender o consistir en un anticuerpo humano que comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia de línea germinal particular. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que está más cerca en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias en los aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o introducción intencionada de mutación dirigida a sitio. Sin embargo, un anticuerpo humanizado es típicamente al menos un 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos de

aminoácidos que identifican al anticuerpo como que deriva de secuencias humanas cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (p. ej., secuencias de la línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humanizado puede ser al menos un 95, 96, 97, 98 o 99 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal excluyendo las CDR. Esto es, las CDR pueden ser murinas, pero las regiones marco de la región variable (bien pesada o ligera) pueden ser al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas en la secuencia de aminoácidos a los aminoácidos marco codificados por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

Típicamente, un anticuerpo humanizado derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10-20 diferencias en los aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humanizado puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias en los aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal (de nuevo, antes de la introducción de cualquier variante de la presente memoria; esto es, el número de variantes es generalmente bajo).

En una realización, el anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se sabe en la técnica. Pueden emplearse métodos basados en la estructura para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en USSN 11/004.590. Pueden emplearse métodos basados en la selección para humanizar y/o madurar por afinidad las regiones variables del anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, los métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294: 151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto solo de partes de las CDR, incluyendo, pero no limitado a, los métodos descritos en USSN 09/810.510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084.

B. Preparación por ingeniería de anticuerpos opcional

Los anticuerpos de la descripción pueden modificarse, o prepararse por ingeniería, para alterar las secuencias de aminoácidos por sustituciones de aminoácidos. Como se discute en la presente memoria, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos para alterar la afinidad de las CDR para la proteína (p. ej., TIGIT o PVRIG, incluyendo tanto incrementar como disminuir la unión), así como para alterar propiedades funcionales adicionales de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden prepararse por ingeniería para incluir modificaciones en la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo según al menos algunas realizaciones de la descripción puede modificarse químicamente (p. ej., pueden unirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Dichas realizaciones se describen adicionalmente más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En un ejemplo, la región bisagra de C_{H1} se modifica de manera que se altera el número de residuos de cisteína en la región bisagra, p. ej., se incrementa o disminuye. Esta estrategia se describe adicionalmente en la Pat. de EE. UU. No. 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de C_{H1} se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otro ejemplo más, el anticuerpo puede modificarse para suprimir el intercambio de brazos de Fab *in vivo*, en particular, cuando se usan los dominios constantes de IgG4. Específicamente, este proceso implica el intercambio de medias moléculas de IgG4 (una cadena pesada más una cadena ligera) entre otros anticuerpos IgG4 lo que da lugar de forma efectiva a anticuerpos biespecíficos que son funcionalmente monovalentes. Las mutaciones en la región bisagra y los dominios constantes de la cadena pesada pueden suprimir este intercambio (véase, Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, *Immunology* 105:9-19). Como se indica en la presente memoria, una mutación que encuentra un uso particular en la presente invención es la S241P en el contexto de un dominio constante de IgG4. IgG4 encuentra uso en la presente invención ya que no tiene una función efectora significativa, y se usa así para bloquear la unión del receptor a su ligando sin la depleción celular (p. ej., PVRIG a PVRL2 o TIGIT a PVR).

En algunos ejemplos, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en la región Fc, en general, para alterar la unión a los receptores FcγR. Por "receptor de Fc gamma", "FcγR" o "FcgammaR", tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificado por un gen de FcγR. En los seres humanos, esta familia incluye, pero no está limitada a, FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65), así como cualesquiera FcγR humanos no descubiertos o isoformas o alotipos de FcγR. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Los FcγR de ratón incluyen, pero no están limitados a, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII-1 (CD 16), y FcγRIII-2 (CD 16-2), así como cualesquiera FcγR de ratón no descubiertos o isoformas o alotipos de FcγR.

Hay varias sustituciones de Fc útiles que pueden hacerse para la alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. Pueden ser útiles las sustituciones que dan lugar a una unión incrementada, así como a una unión disminuida. Por ejemplo, se sabe que la unión incrementada a FcγRIIIa da lugar generalmente a ADCC incrementada (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo; la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. De forma similar, la unión disminuida a FcγRIIb (un receptor inhibidor) puede ser beneficiosa también en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos que encuentran uso en la presente invención incluyen las listadas en Nos. de Ser. U.S. 11/124.620 (particularmente la FIG. 41) y la Patente de EE. UU. No. 6.737.056.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ, y/o incrementar la unión de FcRn, mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase, Shields, R. L. et al. (2001) *J. Biol. Chem*. 276:6591-6604). Se muestra que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se muestra que los siguientes mutantes de combinación mejoran la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Además, las mutaciones tales como M252Y/S254T/T256E o M428L/N434S mejoran la unión a FcRn e incrementan la semivida en circulación del anticuerpo (véase, Chan CA y Carter PJ (2010) *Nature Rev Immunol* 10:301-316).

Además, los anticuerpos de la descripción se modifican para incrementar su semivida biológica. Son posibles varias estrategias. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Pat. de EE. UU. No. 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para incrementar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse en la región C_{H1} o C_L para contener un epítopo de unión de receptor salvaje tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Pat. de EE. UU. Nos. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al. Las mutaciones adicionales para incrementar la semivida en suero se describen en las Patentes de EE. UU. Nos. 8.883.973, 6.737.056 y 7.371.826 e incluyen 428L, 434A, 434S, y 428L/434S.

En otro ejemplo más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno o para reducir la función efectora tal como ADCC. Dichas modificaciones en carbohidratos pueden conseguirse, por ejemplo, alterando uno o más sitos de glicosilación en la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, N297. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de la región variable para eliminar de esta manera la glicosilación en ese sitio, con un reemplazo de alanina encontrando uso en algunas realizaciones.

Adicionalmente o alternativamente, puede prepararse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac bisecadas incrementadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden conseguirse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con una maquinaria de glicosilación alterada y pueden usarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes según al menos algunas realizaciones de la invención para producir de esta manera un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. No. 20040110704 y WO 2003/035835.

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria que se contempla por la descripción es la PEGilación o la adición de otros restos solubles en agua, típicamente polímeros, p. ej., con el fin de aumentar la semivida. Un anticuerpo puede PEGilarse, por ejemplo, para incrementar la semivida biológica (p. eje., en suero) del anticuerpo como se sabe en la técnica.

Además de sustituciones hechas para alterar la afinidad de unión a los FcγR y/o FcRn y/o para incrementar la semivida en suero in vivo, pueden hacerse modificaciones adicionales en los anticuerpos, como se describe con más detalle más adelante.

En algunos casos, se hace maduración por afinidad. Las modificaciones de aminoácidos en las CDR se refieren algunas veces como "maduración por afinidad". Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR lo que da lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta o estas alteraciones. En algunos casos, puede ser deseable disminuir la afinidad de un anticuerpo para su antígeno.

En algunos ejemplos, se hacen una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de los anticuerpos de la invención (anticuerpos frente a PVRIG o TIGIT). En general, solo se sustituyen 1 o 2 o 3-aminoácidos en cualquier

CDR única, y generalmente no se hacen más de 1, 2, 3. 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios en un conjunto de 6 CDR (p. ej., vhCDR1-3 y vlCDR1-3). Sin embargo, debe apreciarse que cualquier combinación de ausencia de sustituciones, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR puede combinarse independientemente y opcionalmente con cualquier otra sustitución.

La maduración por afinidad puede hacerse para incrementar la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno en al menos aproximadamente un 10 % a 50-100-150 % o más, o de 1 a 5 veces en comparación con el anticuerpo "parental". Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por procedimientos conocidos. La correlación de afinidad y eficacia se discute más adelante.

Alternativamente, las modificaciones de aminoácidos pueden hacerse en una o más de las CDR de los anticuerpos de la descripción que son "silenciosas", p. ej., que no alteran significativamente la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Estas pueden hacerse por varias razones, incluyendo optimizar la expresión (como puede hacerse para los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la descripción).

Así, en la definición de las CDR y anticuerpos de la descripción se incluyen CDR y anticuerpos variantes; esto es, los anticuerpos de la descripción pueden incluir modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de los anticuerpos enumerados de la invención. Además, como se indica más adelante, las modificaciones de aminoácidos también pueden hacerse independientemente y opcionalmente en cualquier región fuera de las CDR, incluyendo las regiones marco y constantes.

a. Generación de anticuerpos adicionales

Pueden prepararse anticuerpos adicionales frente a PVRIG humano como es muy conocido en la técnica, usando métodos muy conocidos tales como los indicados en los ejemplos. Así, pueden generarse anticuerpos anti-PVRIG adicionales por métodos tradicionales tales como inmunización de ratones (algunas veces usando inmunización con ADN, por ejemplo, tal como se usa por Aldevron), seguido de cribado frente a la proteína PVRIG humana y generación de hibridomas, con la purificación y recuperación de los anticuerpos.

VII. Anticuerpos frente a TIGIT de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT, como se define en las reivindicaciones. (Por conveniencia, "anticuerpos anti-TIGIT" y "anticuerpos frente a TIGIT" se usan indistintamente). Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se unen específicamente a TIGIT humano, y preferiblemente al ECD de TIGIT humano. La invención proporciona además dominios de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de longitud completa, que contienen varios conjuntos específicos enumerados de 6 CDR, que se unen a TIGIT.

La unión específica para TIGIT o un epítopo de TIGIT puede presentarla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una K_D de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente 10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, al menos aproximadamente 10^{-13} M, al menos aproximadamente 10^{-14} M, al menos aproximadamente 10^{-15} M, o mayor, donde K_D se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una K_D que es 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para una molécula control respecto al antígeno o epítopo de TIGIT.

Sin embargo, para una unión óptima a TIGIT expresado en la superficie de las células NK y T, los anticuerpos tienen preferiblemente una KD menor de 50 nM y lo más preferiblemente menor de 1 nM, encontrando uso en los métodos de la invención menor de 0,1 nM y menor de 1 pM.

También, la unión específica para un antígeno o un epítopo particular la puede presentar, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una ka (que se refiere a la constante de la tasa de asociación) para un antígeno o epítopo de TIGIT de al menos 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 veces o más mayor para el epítopo respecto a un control, donde ka se refiere a la constante de la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se unen a TIGIT humano con una K_D de 100 nM o menor, 50 nM o menor, 10 nM o menor, o 1 nM o menor (esto es, mayor afinidad de unión), o 1pM o menor, en donde K_D se determina por métodos conocidos, p. ej., resonancia de plasmón superficial (SPR, p. ej., ensayos Biacore), ELISA, KINEXA, y lo más típicamente SPR a 25 ° o 37 °C.

Los anticuerpos frente a TIGIT descritos en la presente memoria se marcan como sigue. Los anticuerpos tienen números de referencia, por ejemplo, "CPA.9.086". Esto representa la combinación de las cadenas pesadas variables y ligeras variables, como se representa en la Figura 53, por ejemplo, sabiendo que estos anticuerpos incluyen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. "CPA.9.086.VH" se refiere a la parte pesada variable de CPA. 9. 086, mientras "CPA. 9. 086.VL" es la cadena ligera variable. "CPA. 9.086.vhCDR1", "CPA. 9. 086.vhCDR2", "CPA. 9. 086.vhCDR3", "CPA. 9. 086.vlCDR1", "CPA. 9. 086.vlCDR2", y "CPA. 9. 086.vlCDR3", se refiere a las CDR como se indica. "CPA. 9. 086.HC" se refiere a la cadena pesada completa (p. ej., dominio variable y constante) de esta molécula,

y "CPA. 9. 086.LC" se refiere a la cadena ligera completa (p. ej., dominio variable y constante) de la misma molécula. En general, la cadena ligera kappa humana se usa para el domino constante de cada anticuerpo de fago (o hibridoma humanizado) en la presente memoria, aunque en algunas realizaciones se usa el dominio constante ligero lambda. "CPA. 9. 086.H1" se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesado y ligero variables, incluyendo el dominio constante de IgG1 humana (por lo tanto, las secuencias H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en la Figura 50). Por consiguiente, "CPA. 9. 086. H2" sería los dominios variables de CPA. 9. 086 unidos a una IgG2 humana. "CPA. 9. 086.H3" sería los dominios variables de CPA. 9. 086 unidos a una IgG3 humana, y "CPA. 9. 086.H4" sería los dominios variables de CPA. 9. 086 unidos a una IgG4 humana. Obsérvese que, en algunos casos, las IgG humanas pueden tener mutaciones adicionales, tales como las descritas más adelante, y esto puede anotarse. Por ejemplo, en muchas realizaciones, puede haber una mutación S241P en la IgG4 humana, y esto puede anotarse como "CPA.9.086.H4(S241P)", por ejemplo. La secuencia de IgG4 humana con esta variante de bisagra S241P se muestra en la Figura 50. Otras variantes potenciales son IgG1(N297A), (u otras variantes que eliminan la glicosilación en este sitio y así, muchas de las funciones efectoras asociadas con la unión a FcγRIIIa), e IgG1(D265A), que reduce la unión a los receptores FcγR.

La invención proporciona además dominios pesados y ligeros variables, así como cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, como se define en las reivindicaciones.

En algunos ejemplos, la descripción proporciona scFv que se unen a TIGIT que comprenden un dominio pesado variable y un dominio ligero variable unidos por un conector scFv como se ha indicado anteriormente. Los dominios VL y VH pueden estar en cualquier orientación, p. ej., desde el extremo N al C "VH-conector-VL" o "VL-conector"VH". Se denominan por sus partes componentes; por ejemplo, "scFv-CPA. 9.086. VH-conector-VL" o "scFv-CPA.9.086.VL-conector-VH". Así, "scFv-CPA.9.086" puede estar en cualquier orientación.

En muchas realizaciones, los anticuerpos de la invención son humanos (derivados de fago) y bloquean la unión de TIGIT y PVR. Como se muestra en la Figuras 58 y 75, los anticuerpos CPA que se unen y bloquean la interacción receptor-ligando son como se indica más adelante, con sus componentes también indicados (como se discute en la sección de "Secuencia", las secuencias de todos excepto las construcciones de scFv están en el listado de secuencias):

CPA.9.018, CPA.9.018.VH, CPA.9.018.VL, CPA.9.018.HC, CPA.9.018.LC, CPA.9.018.H1, CPA.9.018.H2, CPA.9.018.H3, CPA.9.018.H4; CPA.9.018.H4(S241P); CPA.9.018.vhCDR1, CPA.9.018.vhCDR2, CPA.9.018.vhCDR3, CPA.9.018.vlCDR1, CPA.9.018.vlCDR2, CPA.9.018.vlCDR3 y scFv-CPA.9.018;

CPA.9.027, CPA.9.027.VH, CPA.9.027.VL, CPA.9.027.HC, CPA.9.027.LC, CPA.9.027.H1, CPA.9.027.H2, CPA.9.027.H3, CPA.9.027.H4; CPA.9.018.H4(S241P); CPA.9.027.vhCDR1, CPA.9.027.vhCDR2, CPA.9.027. vhCDR3, CPA.9.027.vlCDR1, CPA.9.027.vlCDR2, CPA.9.027.vlCDR3 y scFv-CPA.9.027;

CPA.9.049, CPA.9.049.VH, CPA.9.049.VL, CPA.9.049.HC, CPA.9.049.LC, CPA.9.049.H1, CPA.9.049.H2, CPA.9.049.H3; CPA.9.049.H4; CPA.9.049.H4(S241P); CPA.9.049.vhCDR1, CPA.9.049.vhCDR2, CPA.9.049.vhCDR3, CPA.9.049.vlCDR1, CPA.9.049.vlCDR2, CPA.9.049.vlCDR3 y scFv-CPA.9.049;

CPA.9.057, CPA.9.057.VH, CPA.9.057.VL, CPA.9.057.HC, CPA.9.057.LC, CPA.9.057.H1, CPA.9.057.H2, CPA.9.057.H3; CPA.9.057.H4; CPA.9.057.H4(S241P); CPA.9.057.vhCDR1, CPA.9.057.vhCDR2, CPA.9.057. vhCDR3, CPA.9.057.vlCDR1, CPA.9.057.vlCDR2, CPA.9.057.vlCDR3 y scFv-CPA.9.057;

CPA.9.059, CPA.9.059.VH, CPA.9.059.VL, CPA.9.059.HC, CPA.9.059.LC, CPA.9.059.H1, CPA.9.059.H2, CPA.9.059.H3; CPA.9.059.H4; CPA.9.059.H4(S241P); CPA.9.059.vhCDR1, CPA.9.059.vhCDR2, CPA.9.059.vhCDR3, CPA.9.059.vlCDR1, CPA.9.059.vlCDR2, CPA.9.059.vlCDR3 y scFv-CPA.9.059;

CPA.9.083, CPA.9.083.VH, CPA.9.083.VL, CPA.9.083.HC, CPA.9.083.LC, CPA.9.083.H1, CPA.9.083.H2, CPA.9.083.H3; CPA.9.083.H4; CPA.9.083.H4(S241P); CPA.9.083.vhCDR1, CPA.9.083.vhCDR2, CPA.9.083.vhCDR3, CPA.9.083.vlCDR1, CPA.9.083.vlCDR2, CPA.9.083.vlCDR3 y scFv-CPA.9.083;

CPA.9.086, CPA.9.086.VH, CPA.9.086.VL, CPA.9.086.HC, CPA.9.086.LC, CPA.9.086.H1, CPA.9.086.H2, CPA.9.086.H3; CPA.9.086.H4; CPA.9.086.H4(S241P); CPA.9.086.vhCDR1, CPA.9.086.vhCDR2, CPA.9.086.vhCDR3, CPA.9.086.vlCDR1, CPA.9.086.vlCDR2, CPA.9.086.vlCDR3 y scFv-CPA.9.086;

CPA.9.089, CPA.9.089.VH, CPA.9.089.VL, CPA.9.089.HC, CPA.9.089.LC, CPA.9.089.H1, CPA.9.089.H2, CPA.9.089.H3; CPA.9.089.H4; CPA.9.089.H4(S241P); CPA.9.089.vhCDR1, CPA.9.089.vhCDR2, CPA.9.089.vhCDR3, CPA.9.089.vlCDR1, CPA.9.089.vlCDR2, CPA.9.089.vlCDR3 y scFv-CPA.9.089;

CPA.9.093, CPA.9.093.VH, CPA.9.093.VL, CPA.9.093.HC, CPA.9.093.LC, CPA.9.093.H1, CPA.9.093.H2, CPA.9.093.H3; CPA.9.093.H4; CPA.9.093.H4(S241P); CPA.9.093.vhCDR1, CPA.9.093.vhCDR2, CPA.9.093.vhCDR3, CPA.9.093.vlCDR1, CPA.9.093.vlCDR2, CPA.9.093.vlCDR3 y scFv-CPA.9.093;

CPA.9.101, CPA.9.101.VH, CPA.9.101.VL, CPA.9.101.HC, CPA.9.101.LC, CPA.9.101.H1, CPA.9.101.H2, CPA.9.101.H3; CPA.9.101.H4; CPA.9.101.H4(S241P); CPA.9.101.vhCDR1, CPA.9.101.vhCDR2, CPA.9.101.vhCDR3, CPA.9.101.vlCDR1, CPA.9.101.vlCDR2, CPA.9.101.vlCDR3 y scFv-CPA.9.101; y

CPA.9.103, CPA.9.103.VH, CPA.9.103.VL, CPA.9.103.HC, CPA.9.103.LC, CPA.9.103.H1, CPA.9.103.H2, CPA.9.103.H3; CPA.9.103.H4; CPA.9.103.H4(S241P); CPA.9.103.vhCDR1, CPA.9.103.vhCDR2, CPA.9.103.vhCDR3, CPA.9.103.vlCDR1, CPA.9.103.vlCDR2, CPA.9.103.vlCDR3 y scFv-CPA.9.103.

Además, la presente descripción proporciona varios anticuerpos CHA, que son anticuerpos murinos generados a partir de hibridomas. Como se conoce bien en la técnica, las seis CDR son útiles cuando se ponen en regiones pesadas variables y ligeras variables de marco humano o cuando los dominios pesado y ligero variables se humanizan.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos, habitualmente de longitud completa o dominios scFv, que comprenden los siguientes conjuntos de CDR, cuyas secuencias se muestran en la Figura 53 y/o en el listado de secuencias:

CHA.9.536.1, CHA.9.536.1.VH, CHA.9.536.1.VL, CHA.9.536.1.HC, CHA.9.536.1.LC, CHA.9.536.1.H1, CHA.9.536.1.H2, CHA.9.536.1.H3; CHA.9.536.1.H4, CHA.9.536.1. H4(S241P), CHA.9.536.1.vhCDR1, CHA.9.536.1. vhCDR2, CHA.9.536.1.vhCDR3, CHA.9.536.1.vlCDR1, CHA.9.536.1.vlCDR2 y CHA.9.536.1. vhCDR3;

CHA.9.536.3, CHA.9.536.3.VH, CHA.9.536.3.VL, CHA.9.536.3.HC, CHA.9.536.3.LC, CHA.9.536.3.H1, CHA.9.536.3.H2, CHA.9.536.3.H3; CHA.9.536.3.H4, CHA.9.536.3.H4(S241P); CHA.9.536.3.vhCDR1, CHA.9.536.3.vhCDR2, CHA.9.536.3.vhCDR3, CHA.9.536.3.vlCDR1, CHA.9.536.3.vlCDR2 y CHA.9.536.3.vhCDR3;

CHA.9.536.4, CHA.9.536.4.VH, CHA.9.536.4.VL, CHA.9.536.4.HC, CHA.9.536.4.LC, CHA.9.536.4.H1, CHA.9.536.4.H2, CHA.9.536.4.H3; CHA.9.536.4.H4, CHA.9.536.4.H4(S241P), CHA.9.536.4.vhCDR1, CHA.9.536.4.vhCDR2, CHA.9.536.4.vhCDR3, CHA.9.536.4.vlCDR1, CHA.9.536.4.vlCDR2 y CHA.9.536.4.vhCDR3;

CHA.9.536.5, CHA.9.536.5.VH, CHA.9.536.5.VL, CHA.9.536.5.HC, CHA.9.536.5.LC, CHA.9.536.5.H1, CHA.9.536.5.H2, CHA.9.536.5.H3; CHA.9.536.5.H4, CHA.9.536.5.H4(S241P), CHA.9.536.5.vhCDR1, CHA.9.536.5.vhCDR2, CHA.9.536.5.vhCDR3, CHA.9.536.5.vlCDR1, CHA.9.536.5.vlCDR2 y CHA.9.536.5.vhCDR3;

CHA.9.536.6, CHA.9.536.6.VH, CHA.9.536.6.VL, CHA.9.536.6.HC, CHA.9.536.6.LC, CHA.9.536.6.H1, CHA.9.536.6.H2, CHA.9.536.6.H3; CHA.9.536.6.H4, CHA.9.536.6.vhCDR1, CHA.9.536.6.vhCDR2, CHA.9.536.6.vhCDR3, CHA.9.536.6.vlCDR1, CHA.9.536.6.vlCDR2 y CHA.9.536.6.vhCDR3;

CHA.9.536.7, CHA.9.536.7.VH, CHA.9.536.7.VL, CHA.9.536.7.HC, CHA.9.536.7.LC, CHA.9.536.7.H1, CHA.9.536.7.H2, CHA.9.536.7.H3; CHA.9.536.7.H4, CHA.9.536.5.H4(S241P); CHA.9.536.7.vhCDR1, CHA.9.536.7.vhCDR2, CHA.9.536.7.vhCDR3, CHA.9.536.7.vlCDR1, CHA.9.536.7.vlCDR2 y CHA.9.536.7.vhCDR3;

CHA.9.536.8, CHA.9.536.8.VH, CHA.9.536.8.VL, CHA.9.536.8.HC, CHA.9.536.8.LC, CHA.9.536.8.H1, CHA.9.536.8.H2, CHA.9.536.8.H3; CHA.9.536.8.H4, CHA.9.536.8.H4(S241P), CHA.9.536.8.vhCDR1, CHA.9.536.8.vhCDR2, CHA.9.536.8.vhCDR3, CHA.9.536.8.vlCDR1, CHA.9.536.8.vlCDR2 y CHA.9.536.8.vhCDR3;

CHA.9.560.1, CHA. 9.560.1.VH, CHA. 9.560.1.VL, CHA. 9.560.1.HC, CHA. 9.560.1.LC, CHA. 9.560.1.H1, CHA. 9.560.1.H2, CHA. 9.560.1.H3; CHA. 9.560.1.H4, CHA.9.560.1.H4(S241P), CHA. 9.560.1.vhCDR1, CHA. 9.560.1.vhCDR2, CHA. 9.560.1.vhCDR3, CHA. 9.560.1.vlCDR1, CHA. 9.560.1.vlCDR2 y CHA. 9.560.1.vhCDR3;

CHA.9.560.3, CHA. 9.560. 3VH, CHA. 9.560. 3.VL, CHA. 9.560. 3.HC, CHA.9.560. 3.LC, CHA. 9.560. 3.H1, CHA. 9.560. 3.H2, CHA. 9.560. 3.H3; CHA.9.560.3.H4, CHA.9.560.3.H4(S241P); CHA. 9.560. 3.vhCDR1, CHA. 9.560. 3.vhCDR2, CHA. 9.560. 3.vhCDR3, CHA. 9.560. 3.vlCDR1, CHA. 9.560. 3.vlCDR2 y CHA. 9.560. 3.vhCDR3;

CHA.9.560.4, CHA. 9.560. 4VH, CHA. 9.560. 4.VL, CHA. 9.560. 4.HC, CHA.9.560. 4.LC, CHA. 9.560. 4.H1, CHA. 9.560. 4.H2, CHA. 9.560. 4.H3; CHA.9.560.4.H4, CHA.9.560.4.H4(S241P), CHA. 9.560. 4.vhCDR1, CHA. 9.560. 4.vhCDR2, CHA. 9.560. 4.vhCDR3, CHA. 9.560. 4.vlCDR1, CHA. 9.560. 4.vlCDR2 y CHA. 9.560. 4.vhCDR3;

CHA.9.560.5, CHA. 9.560. 5VH, CHA. 9.560. 5.VL, CHA. 9.560. 5.HC, CHA.9.560. 5.LC, CHA. 9.560. 5.H1, CHA. 9.560. 5.H2, CHA. 9.560. 5.H3; CHA. 9.560. 5.H4, CHA. 9.560. 5.vhCDR1, CHA. 9.560. 5.vhCDR2, CHA. 9.560. 5.vhCDR3, CHA. 9.560. 5.vlCDR1, CHA. 9.560. 5.vlCDR2 y CHA. 9.560. 5.vhCDR3;

CHA.9.560.6, CHA. 9.560. 6VH, CHA. 9.560. 6.VL, CHA. 9.560. 6.HC, CHA.9.560. 6.LC, CHA. 9.560. 6.H1, CHA. 9.560. 6.H2, CHA. 9.560. 6.H3; CHA.9.560.6.H4, CHA.9.560.6.H4(S241P), CHA. 9.560. 6.vhCDR1, CHA. 9.560. 6.vhCDR2, CHA. 9.560. 6.vhCDR3, CHA. 9.560. 6.vlCDR1, CHA. 9.560. 6.vlCDR2 y CHA. 9.560. 6.vhCDR3;

CHA.9.560.7, CHA. 9.560. 7VH, CHA. 9.560. 7.VL, CHA. 9.560. 7.HC, CHA.9.560. 7.LC, CHA. 9.560. 7.H1, CHA. 9.560. 7.H2, CHA. 9.560. 7.H3; CHA.9.560.7.H4; CHA.9.560.7.H4(S241P); CHA. 9.560. 7.vhCDR1, CHA. 9.560. 7.vhCDR2, CHA. 9.560. 7.vhCDR3, CHA. 9.560. 7.vlCDR1, CHA. 9.560. 7.vlCDR2 y CHA. 9.560. 7.vhCDR3;

CHA.9.560.8, CHA. 9.560. 8VH, CHA. 9.560. 8.VL, CHA. 9.560. 8.HC, CHA.9.560. 8.LC, CHA. 9.560. 8.H1, CHA. 9.560. 8.H2, CHA. 9.560. 8.H3; CHA.9.560.8.H4, CHA.9.560.8.H4(S241P); CHA. 9.560. 8.vhCDR1, CHA. 9.560. 8.vhCDR2, CHA. 9.560. 8.vhCDR3, CHA. 9.560. 8.vlCDR1, CHA. 9.560. 8.vlCDR2 y CHA. 9.560. 8.vhCDR3;

CHA.9.546.1, CHA. 9. 546.1VH, CHA. 9. 546.1.VL, CHA. 9. 546.1.HC, CHA. 9.546.1.LC, CHA. 9. 546.1.H1, CHA. 9. 546.1.H2, CHA. 9. 546.1.H3; CHA.9.546.1. H4, CHA.9.546.1.H4(S241P), CHA. 9. 546.1.vhCDR1, CHA. 9. 546.1.vhCDR2, CHA. 9. 546.1.vhCDR3, CHA. 9. 546.1.vlCDR1, CHA. 9. 546.1.vlCDR2 y CHA. 9. 546.1.vhCDR3;

CHA.9.547.1, CHA. 9. 547.1VH, CHA. 9. 547.1.VL, CHA. 9. 547.1.HC, CHA. 9.547.1.LC, CHA. 9. 547.1.H1, CHA. 9. 547.1.H2, CHA. 9. 547.1.H3; CHA.9.547.1. H4, CHA.9.547.1.H4(S241P), CHA. 9. 547.1.vhCDR1, CHA. 9. 547.1.vhCDR2, CHA. 9. 547.1.vhCDR3, CHA. 9. 547.1.vlCDR1, CHA. 9. 547.1.vlCDR2 y CHA. 9. 547.1.vhCDR3;

CHA.9.547.2, CHA. 9. 547. 2VH, CHA. 9. 547. 2.VL, CHA. 9. 547. 2.HC, CHA. 9.547. 2.LC, CHA. 9. 547. 2.H1, CHA. 9. 547. 2.H2, CHA. 9. 547. 2.H3; CHA.9.547.2.H4, CHA.9.547.2.H4(S241P), CHA. 9. 547. 2.vhCDR1, CHA. 9. 547. 2.vhCDR2, CHA. 9. 547.2. vhCDR3, CHA. 9. 547. 2.vlCDR1, CHA. 9. 547. 2.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 2.vhCDR3;

CHA.9.547.3, CHA. 9. 547. 3VH, CHA. 9. 547. 3.VL, CHA. 9. 547. 3.HC, CHA. 9.547. 3.LC, CHA. 9. 547. 3.H1, CHA. 9. 547. 3.H2, CHA. 9. 547. 3.H3; CHA.9.547.3.H4, CHA.9.547.3.H4(S241P), CHA. 9. 547. 3.vhCDR1, CHA. 9.547. 3.vhCDR2, CHA. 9. 547.3. vhCDR3, CHA. 9. 547. 3.vlCDR1, CHA. 9. 547. 3.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 3.vhCDR3;

CHA.9.547.4, CHA. 9. 547. 4VH, CHA. 9. 547. 4.VL, CHA. 9. 547. 4.HC, CHA.9.547. 4.LC, CHA. 9. 547. 4.H1, CHA. 9. 547. 4.H2, CHA. 9. 547. 4.H3; CHA.9.547.4.H4, CHA.9.547.4.H4(S241P), CHA. 9. 547. 4.vhCDR1, CHA. 9. 547. 4.vhCDR2, CHA. 9. 547.4. vhCDR3, CHA. 9. 547. 4.vlCDR1, CHA. 9. 547. 4.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 4.vhCDR3;

CHA.9.547.6, CHA. 9. 547. 6 VH, CHA. 9. 547. 6.VL, CHA. 9. 547. 6.HC, CHA. 9.547. 6.LC, CHA. 9. 547. 6.H1, CHA. 9. 547. 6.H2, CHA. 9. 547. 6.H3; CHA.9.547.6.H4, CHA.9.547.6.H4(S241P), CHA. 9. 547. 6.vhCDR1, CHA. 9. 547. 6.vhCDR2, CHA. 9. 547.6. vhCDR3, CHA. 9. 547. 6.vlCDR1, CHA. 9. 547. 6.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 6.vhCDR3;

CHA.9.547.7, CHA. 9. 547. 7VH, CHA. 9. 547. 7.VL, CHA. 9. 547. 7.HC, CHA. 9.547. 7.LC, CHA. 9. 547. 7.H1, CHA. 9. 547. 7.H2, CHA. 9. 547. 7.H3; CHA.9.547.7.H4, CHA.9.547.7.H4(S241P), CHA. 9. 547. 7.vhCDR1, CHA. 9. 547. 7.vhCDR2, CHA. 9. 547.7. vhCDR3, CHA. 9. 547. 7.vlCDR1, CHA. 9. 547. 7.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 7.vhCDR3;

CHA.9.547.8, CHA. 9. 547. 8VH, CHA. 9. 547. 8.VL, CHA. 9. 547. 8.HC, CHA.9.547.8.LC, CHA. 9. 547. 8.H1, CHA. 9. 547. 8.H2, CHA. 9. 547. 8.H3; CHA.9.547.8.H4, CHA.9.547.8.H4(S241P), CHA. 9. 547. 8.vhCDR1, CHA. 9. 547. 8.vhCDR2, CHA. 9. 547.8. vhCDR3, CHA. 9. 547. 8.vlCDR1, CHA. 9. 547. 8.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 8.vhCDR3;

CHA.9.547.9, CHA.9.547.9, CHA.9.547.9VH, CHA.9.547.9.VL, CHA.9. 547.9.HC, CHA.9.547.9.LC, CHA.9.547.9.H1, CHA.9.547.9.H2, CHA.9.547.9.H3; CHA.9.547.9.H4, CHA.9.547.9.H4, CHA.9.547.9.H4(S241P), CHA.9.547.9.H4(S241P), CHA.9.547.9.vhCDR1, CHA.9.547.9.vhCDR2, CHA.9.547.9.vhCDR3, CHA.9.547.9.vlCDR1, CHA.9.547.9.vlCDR2 y CHA.9.547.9.vhCDR3;

CHA.9.547.13, CHA.9.547.13, CHA.9.547. 13VH, CHA.9. 547.13.VL, CHA.9.547.13.HC, CHA. 9.547.13.LC, CHA. 9.547.13.H1, CHA.9.547.13.H2, CHA.9. 547.13.H3; CHA.9.547.13.H4, CHA.9.547.13.H4, CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA. 9. 547.13.vhCDR1, CHA.9.547.13.vhCDR2, CHA.9.547. 13.vhCDR3, CHA. 9. 547.13.vlCDR1, CHA. 9. 547.13.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 13.vhCDR3;

CHA.9.541.1, CHA. 9. 541.1.VH, CHA. 9. 541.1.VL, CHA. 9. 541.1.HC, CHA. 9.541. LLC, CHA. 9. 541.1.H1, CHA. 9. 541.1.H2, CHA. 9. 541.1.H3; CHA.9.541.1.H4, CHA.9.541.1.H4(S241P), CHA. 9. 541.1.vhCDR1, CHA. 9. 541.1.vhCDR2, CHA. 9. 541.1.vhCDR3, CHA. 9. 541.1.VlCDR1, CHA. 9. 541.1.vlCDR2 y CHA. 9.541. 1.vhCDR3;

CHA.9.541.3, CHA. 9. 541. 3.VH, CHA. 9. 541. 3.VL, CHA. 9. 541. 3.HC, CHA. 9.541. 3.LC, CHA. 9. 541. 3.H1, CHA. 9. 541. 3.H2, CHA. 9. 541. 3.H3; CHA.9.541.3.H4, CHA.9.541.3.H4(S241P), CHA. 9. 541. 3.vhCDR1, CHA. 9. 541. 3.vhCDR2, CHA. 9. 541.3. vhCDR3, CHA. 9. 541. 3.vlCDR1, CHA. 9. 541. 3.vlCDR2 y CHA. 9.541. 3.vhCDR3;

CHA.9.541.4, CHA. 9. 541.4.VH, CHA. 9. 541. 4.VL, CHA. 9. 541. 4.HC, CHA. 9.541. 4.LC, CHA. 9. 541. 4.H1, CHA. 9. 541. 4.H2, CHA. 9. 541. 4.H3; CHA.9.541.4.H4, CHA.9.541.4.H4(S241P), CHA. 9. 541. 4.vhCDR1, CHA. 9. 541. 4.vhCDR2, CHA. 9. 541.4. vhCDR3, CHA. 9. 541. 4.vlCDR1, CHA. 9. 541. 4.vlCDR2 y CHA. 9.541. 4.vhCDR3;

CHA.9.541.5, CHA. 9. 541. 5.VH, CHA. 9. 541. 5.VL, CHA. 9. 541. 5.HC, CHA. 9.541. 5.LC, CHA. 9. 541. 5.H1, CHA. 9. 541. 5.H2, CHA. 9. 541. 5.H3; CHA.9.541.5.H4, CHA.9.541.5.H4(S241P), CHA. 9. 541. 5.vhCDR1, CHA. 9. 541. 5.vhCDR2, CHA. 9. 541.5. vhCDR3, CHA. 9. 541. 5.vlCDR1, CHA. 9. 541. 5.vlCDR2 y CHA. 9.541. 5.vhCDR3;

CHA.9.541.6, CHA. 9. 541. 6.VH, CHA. 9. 541. 6.VL, CHA. 9. 541. 6.HC, CHA. 9.541. 6.LC, CHA. 9. 541. 6.H1, CHA. 9. 541. 6.H2, CHA. 9. 541.6.H3; CHA.9.541.6.H4, CHA.9.541.6.H4(S241P), CHA. 9. 541. 6.vhCDR1, CHA. 9. 541. 6.vhCDR2, CHA. 9. 541.6. vhCDR3, CHA. 9. 541. 6.vlCDR1, CHA. 9. 541. 6.vlCDR2 y CHA. 9.541. 6.vhCDR3;

CHA.9.541.7, CHA. 9. 541. 7.VH, CHA. 9. 541. 7.VL, CHA. 9. 541. 7.HC, CHA. 9.541. 7.LC, CHA. 9. 541. 7.H1, CHA. 9. 541. 7.H2, CHA. 9. 541. 7.H3; CHA.9.541.7.H4, CHA.9.541.7.H4(S241P), CHA. 9. 541. 7.vhCDR1, CHA. 9. 541. 7.vhCDR2, CHA. 9. 541.7. vhCDR3, CHA. 9. 541. 7.vlCDR1, CHA. 9. 541. 7.vlCDR2 y CHA. 9.541. 7.vhCDR3; y

CHA.9.541.8, CHA. 9. 541. 8.VH, CHA. 9. 541. 8.VL, CHA. 9. 541. 8.HC, CHA. 9.541. 8.LC, CHA. 9. 541. 8.H1, CHA. 9. 541. 8.H2, CHA. 9. 541. 8.H3; CHA.9.541.8.H4, CHA.9.541.8.H4(S241P); CHA. 9. 541. 8vhCDR1, CHA. 9. 541. 8.vhCDR2, CHA. 9. 541.8.vhCDR3, CHA. 9. 541. 8.vlCDR1, CHA. 9. 541. 8.vlCDR2 y CHA. 9.541. 8.vhCDR3.

En el caso de los scFv que comprenden las CDR de los anticuerpos anteriores, estos se marcan como scFv que incluyen un scFv que comprende un dominio pesado variable con las vhCDR, un conector y un dominio ligero variable con las vlCDR, de nuevo como anteriormente en cualquier orientación. Así la descripción incluye scFv-CHA.9.536.3.1, scFv-CHA.9.536.3, scFv-CHA.9.536.4, scFv-CHA.9.536.5, scFv-CHA.9.536.7, scFv-CHA.9.536.8, scFv-CHA.9.560.1, scFv-CHA.9.560.3, scFv-CHA.9.560.4, scFv-CHA.9.560.5, scFv-CHA.9.560.6, scFv-CHA.9.560.7, scFv-CHA.9.560.8, scFv-CHA.9.546.1, scFv-CHA.9.547.1, scFv-CHA.9.547.2, scFv-CHA.9.547.3, scFv-CHA.9.547.4, scFv-CHA.9.547.6, scFv-CHA.9.547.7, scFv-CHA.9.547.8, scFv-CHA.9.547.9, scFv-CHA.9.547.13, scFv-CHA.9.541.1, scFv-CHA.9.541.3, scFv-CHA.9.541.4, scFv-CHA.9.541.5, scFv-CHA.9.541.6, scFv-CHA.9.541.7 y scFv-CHA.9.541.8.

Además, CHA.9.543 se une a TIGIT, pero no bloquea la interacción TIGIT-PVR.

Como se discute en la presente memoria, la descripción proporciona además variantes de los componentes anteriores (CPA y CHA), incluyendo variantes en las CDR, como se ha indicado anteriormente. Así, la descripción proporciona anticuerpos que comprenden un conjunto de 6 CDR, como se indica en la presente memoria que puede contener una, dos o tres diferencias en los aminoácidos en el conjunto de las CDR, siempre que el anticuerpo todavía se una a TIGIT. Los ensayos adecuados para ensayar si un anticuerpo anti-TIGIT contiene mutaciones en comparación con las secuencias de CDR indicadas en la presente memoria son conocidos en la técnica, tales como los ensayos Biacore.

Además, la descripción proporciona además variantes de las cadenas pesadas y ligeras variables anteriores. En este caso, las cadenas pesadas variables pueden ser un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "VH" de la presente memoria, y/o contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. Se proporcionan cadenas ligeras variables que pueden ser un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "VL" de la presente memoria (y, en particular, CPA.9.086), y/o contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. La descripción incluye estas variantes siempre que el anticuerpo todavía se una a TIGIT. Los ensayos adecuados para ensayar si un anticuerpo anti-TIGIT contiene mutaciones en comparación con las secuencias de CDR indicadas en la presente memoria son conocidos en la técnica, tales como los ensayos Biacore.

De forma similar, se proporcionan cadenas pesadas y ligeras que son un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "HC" y "LC" de longitud completa de la presente memoria (y, en particular, CPA.9.086), y/o contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. En estos casos, la descripción incluye estas variantes siempre que el anticuerpo todavía se una a TIGIT. Los ensayos adecuados para ensayar si un anticuerpo anti-TIGIT contiene mutaciones en comparación con las secuencias de CDR indicadas en la presente memoria son conocidos en la técnica, tales como los ensayos Biacore.

Además, las regiones marco de las cadenas pesada variable y ligera variable de los anticuerpos CPA o CHA de la presente memoria pueden humanizarse (o, en el caso de los anticuerpos CHA, "rehumanizarse", hasta el grado en el que pueden hacerlo los métodos de humanización alternativos) como se sabe en la técnica (con variantes ocasionales generadas en las CDR, según se necesite), y así pueden generarse variantes humanizadas de las cadenas VH y VL de la Figura 53 (y, en particular, CPA.9.086). Además, los dominios pesado y ligero variables humanizados pueden fusionarse entonces con regiones constantes humanas, tales como las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (incluyendo IgG4(S241P)).

En particular, como se sabe en la técnica, las cadenas VH y VL murinas pueden humanizarse como se sabe en la técnica, por ejemplo, usando el programa IgBLAST del sitio de internet NCBI, como se indica en Ye et al. Nucleic Acids Res. 41:W34-W40 (2013). IgBLAST toma una secuencia de VH y/o VL murina y la compara con una biblioteca de secuencias de la línea germinal humana conocidas. Como se muestra en la presente memoria, para las secuencias humanizadas generadas en la presente memoria, las bases de datos usadas fueron genes de VH humano IMGT (F+ORF, 273 secuencias de la línea germinal) y genes VL kappa humanos IMGT (F+ORF, 74 secuencias de la línea germinal). Se eligieron cinco secuencias de CHA ejemplares: CHA.9.536, CHA9.560, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.541 (véase la Figura 53). Para esta realización de la humanización, se eligió IGHV1-46(alelo1) de la línea germinal humana para los 5 como la secuencia aceptora y la región de unión de la cadena pesada humana IGHJ4(alelo 1) (gen J). Para tres de los cuatro (CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2), se eligió IGKV1-39(alelo 1) de la línea germinal humana como la secuencia aceptora y se eligió la cadena ligera humana IGKJ2(alelo 1) (gen J). El gen J se eligió de las secuencias de la región de unión humana compiladas en IMGT® el sistema de información internacional ImMunoGeneTics como www.imgt.org. Las CDR se definieron según la definición de AbM (véase, www.bioinfo.org.uk/abs/).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TIGIT de la presente descripción incluyen anticuerpos anti-TIGIT en donde las secuencias de V_H y V_L de diferentes anticuerpos anti-TIGIT pueden "mezclarse y concordarse" para crear otros anticuerpos anti-TIGIT. La unión de TIGIT de dichos anticuerpos "mezclados y concordados" puede ensayarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente, p. ej., ensayos ELISA o Biacore). En algunas realizaciones, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y concuerdan, una secuencia de V_H de una pareja V_H/V_L particular se

reemplaza con una secuencia de V_H estructuralmente similar. Asimismo, en algunas realizaciones, una secuencia de V_L de una pareja V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia de V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de V_H y V_L de anticuerpos homólogos son particularmente idóneas para mezclado y concordado.

Por consiguiente, los anticuerpos frente a TIGIT de la invención comprenden secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas del grupo que consiste en (a) secuencias como se listan en la presente memoria; (b) secuencias que se diferencian de las secuencias de aminoácidos de CDR especificadas en (a) en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos; (c) secuencias de aminoácidos que tienen un 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad de secuencia con las secuencias especificadas en (a) o (b); (d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica los aminoácidos como se listan en la presente memoria. En particular, el anticuerpo CPA.9.086 puede tener secuencias seleccionadas de (a), (b), (c) o (d).

En la definición de anticuerpos frente a TIGIT se incluyen adicionalmente los anticuerpos que comparten identidad con los anticuerpos frente a TIGIT enumerados en la presente memoria. Esto es, en determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TIGIT según la descripción comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son idénticas a todo o parte de las secuencias de aminoácidos anti-TIGIT de los anticuerpos anti-TIGIT preferidos, respectivamente, en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-TIGIT parentales. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología= no. de posiciones idénticas/no. total de posiciones X 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos siguientes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol*. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible comercialmente), usando bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente descripción pueden usarse además como una "secuencia de búsqueda" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J Mol. Biol*. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas en BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo según al menos algunas realizaciones de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST).

En general, el porcentaje de identidad para la comparación entre anticuerpos frente a TIGIT es al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, prefiriéndose al menos aproximadamente un 95, 96, 97, 98 o 99 % de porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad puede ser a lo largo de la secuencia de aminoácidos completa, por ejemplo, la cadena pesada o ligera completa o a lo largo de una parte de las cadenas. Por ejemplo, en la definición de los anticuerpos anti-TIGIT de la descripción se incluyen aquellos que comparten identidad a lo largo de la región variable completa (por ejemplo, cuando la identidad es del 95 o 98 % idéntica a lo largo de las regiones variables), o a lo largo de la región constante completa, o a lo largo solo del dominio Fc. En particular, la descripción proporciona anticuerpos frente a TIGIT que tienen al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, prefiriéndose al menos aproximadamente un 95, 96, 97, 98 o 99 % de porcentaje de identidad, con el anticuerpo CPA.9.086.

Además, también están incluidas las secuencias que pueden tener las CDR idénticas, pero cambios en las partes marco del dominio variable (o cadena pesada o ligera completa). Por ejemplo, los anticuerpos frente a TIGIT incluyen aquellos con CDR idénticas a las mostradas en la Figura 53, pero cuya identidad a lo largo de la región variable puede ser menor, por ejemplo, un 95 o 98 % por ciento idéntica. En particular, la descripción proporciona anticuerpos frente a TIGIT que tienen CDR idénticas a CPA.9.086, pero con regiones marco que son un 95 o 98 % idénticas a CPA.9.086.

A. Anticuerpos frente a TIGIT que compiten por la unión

La presente descripción proporciona no solo los anticuerpos enumerados, sino anticuerpos adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados (los números CPA enumerados en la presente memoria que se unen específicamente a TIGIT) que se unen específicamente a la molécula TIGIT. Como se muestra en el Ejemplo 16, los anticuerpos frente a TIGIT de la descripción se "preclasifican" en diferentes clases de epítopos. Entre los 44 anticuerpos frente a TIGIT en el estudio de preclasificación de epítopos, hay cuatro comunidades, teniendo cada una patrones de bloqueo por parejas relacionados, que las separan en 12 clases discretas totales indicadas en la presente memoria y mostradas

en la Figuras 67 y 68. Hay doce clases discretas indicadas en la presente memoria; 1) BM9-H4, CHA.9.525, CPA.9.081-H4, CHA.9.538, CHA.9.553, CPA.9.069-H4, CHA.9.543, CHA.9.556, CPA.9.077-H4 y CHA.9.561; 2) CHA.9.560 y CHA.9.528; 3) CHA.9.552, CHA.9.521, CHA.9.541, CHA.9.529, CHA.9.519, CHA.9.527 y CHA.9.549; 4) CPA.9.057-H4 y CHA.9.554; 5) CHA.9.546, CPA.9.012-H4, CHA.9.547, CPA.9.013-H4, CPA.9.018-H4, MBSA43-M1, Sino PVR-Fc(ligando), CHA.9.555, PVR-Fc M2A(ligando), BM29-H4, CPA.9.027-H4, CPA.9.049-H4 y CPA.9.053-H4; 6) CPA.9.064-H4; 7) BM26-H4; 8) CPA.9.059-H4; 9) CHA.9.535 y CPA.9.009-H4; 10) CHA.9.536, CHA.9.522 y CPA.9.015-H4; 11) CPA.9.011-H4 y BM8-H4 y 12) CPA.9.071-H4.

Así, la descripción proporciona anticuerpos anti-TIGIT que compiten por la unión con anticuerpos que están en las clases de epítopos discretas 1 a 12. En una realización particular, la descripción proporciona anticuerpos anti-TIGIT que compiten por la unión con CPA.9.086 y son al menos un 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticos a CPA.9.086.

Se general anticuerpos adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados, como se sabe en la técnica y generalmente indicados más adelante. Los ensayos de unión competitiva pueden hacerse como se sabe en la técnica, generalmente usando ensayos de unión SPR/Biacore®, así como ELISA y ensayos basados en células.

VIII. Anticuerpos frente a PVRIG

La presente invención proporciona anticuerpos anti-PVRIG. (Para conveniencia, "anticuerpos anti-PVRIG" y "anticuerpos frente a PVRIG" se usan indistintamente). Los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se unen específicamente a PVRIG humano, y preferiblemente al ECD de PVRIG humano.

La unión específica para PVRIG o un epítopo de PVRIG puede presentarla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una KD de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente 10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 veces mayor o más para una molécula control respecto al antígeno o epítopo de PVRIG.

Sin embargo, como se muestra en los Ejemplos de WO2016/134333, para una unión óptima a PVRIG expresado en la superficie de las células NK y T, los anticuerpos preferiblemente tienen una KD menor de 50 nM y lo más preferiblemente menor de 1 nM, encontrando uso en los métodos de la invención menor de 0,1 nM y menor de 1 pM y 0,1 pM.

También, la unión específica para un antígeno o un epítopo particular puede presentarla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítopo de PVRIG de al menos 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 veces mayor o más para el epítopo respecto a un control, donde KA o Ka se refiere a una tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se unen a PVRIG humano con una K_D de 100 nM o menor, 50 nM o menor, 10 nM o menor, o 1 nM o menor (esto es, mayor afinidad de unión), o 1 pM o menor, en donde K_D se determina por métodos conocidos, p. ej., resonancia de plasmón superficial (SPR, p. ej., ensayos Biacore), ELISA, KINEXA, y lo más típicamente SPR a 25 ° o 37 °C.

Es importante indicar que la afinidad de unión para los anticuerpos anti-PVRIG se correlaciona sorprendentemente con la actividad. Un análisis acumulativo de datos de cribado muestra que la afinidad de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se correlaciona altamente con su capacidad de unirse a células T humanas primarias. Más específicamente, los anticuerpos que proporcionaron la máxima señal más alta en las células T células fueron aquellos con afinidades en el rango picomolar. Los anticuerpos que tuvieron afinidades en el rango nanomolar bajo y por encima proporcionaron señales máximas relativamente débiles en las células T. Así, los datos indican que la utilidad de los anticuerpos anti-PVRIG para la inmunoterapia basada en las células T puede definirse probablemente, en parte, sobre la base de su afinidad. Se hace referencia a las secuencias de anticuerpos de WO2016/134333 y, en particular, para los dominios de unión a antígeno del anti-PVRIG indicados en las Figuras 38 (que representa secuencias que se unen a PVRIG y bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2), Figura 39 (que representa secuencias que se unen a PVRIG y no bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2), Figura 40 (que representa CDR y datos de estos anticuerpos), y Figura 41 (que representa CDR de hibridomas que se unen y bloquean). Esto es, las Figuras y Leyendas, así como las secuencias particulares y las SEQ ID NO:s de todos los anticuerpos CPA.7 y CHA.7 (incluyendo las secuencias de CDR, VH y VL y de longitud completa) de WO2016/134333 se incorporan expresamente en la presente memoria.

La Figura 45 ilustra la capacidad de dos anticuerpos anti-PVRIG con diferentes afinidades para unirse a las células T CD8 primarias. Como se muestra en la Figura 45, CHA.7.518 tiene una afinidad aproximadamente 8 veces mayor que CP A.7.021 (secuencia en WO2016/13433), según se mide por la unión a células HEK preparadas por ingeniería para sobreexpresar PVRIG (HEK hPVRIG). Consistente con esto, CHA.7.518 tiene una afinidad aproximadamente 13 veces mayor que CPA.7.021, según se mide por la unión a células Jurkat. La mayor afinidad de CHA.7.518 se correspondió con una señal de unión máxima mayor de células HEK hPVRIG, pero no de células Jurkat.

Por el contrario, CHA.7.518 proporcionó de manera consistente una señal de unión máxima mayor de células T CD8 primarias, en comparación con CPA.7.021. Esto se ilustra en un experimento de titulación de unión donde diferentes concentraciones de anticuerpos de isotipo o anti-PVRIG se añadieron a células T CD8 primarias, y se midió la señal de unión máxima resultante. En los dos donantes ilustrados (Figura 45), CHA.7.518 proporcionó de manera consistente una señal máxima mayor (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, gMFI) que CPA.7.021 de una manera dependiente de la titulación. gMFIr= intensidad de la fluorescencia geométrica del anticuerpo de interés/intensidad de la fluorescencia geométrica del anticuerpo control. La gMFIr mide la señal que el anticuerpo de interés proporciona respecto a un anticuerpo de isotipo a una concentración fijada de ambos.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención tienen afinidades de unión (según se mide usando técnicas indicadas en la presente memoria) en el rango picomolar, p. ej., de 0,1 a 9 pM, prefiriéndose de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2, y siendo de uso particular de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5.

Como para los anticuerpos frente a TIGIT, los anticuerpos frente a PVRIG se marcan de forma similar como sigue. Los anticuerpos tienen números de referencia, por ejemplo, "CHA.7.518.1". Esto representa la combinación de las cadenas pesada variable y ligera variable, como se representa en la Figura 3, por ejemplo, sabiendo que estos anticuerpos incluyen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. "CPA.7.518.1.VH" se refiere a la parte pesada variable de CPA.7.518.1, mientras "CPA.7.518.1.VL" es la cadena ligera variable. "CPA.7.518.1.vhCDR1", "CPA.7.518.1.vhCDR2", "CPA.7.518.1.vhCDR3", "CPA.7.518.1.vlCDR1", "CPA.7.518.1.vlCDR2", y "CPA.7.518.1.vlCDR3", se refiere a las CDR se indican. "CPA.7.518.1.HC" se refiere a la cadena pesada completa (p. ej., dominio variable y constante) de esta molécula, y "CPA.7.518.1.LC" se refiere a la cadena ligera completa (p. ej., dominio variable y constante) de la misma molécula. En general, se usa la cadena ligera kappa humana para el dominio constante de cada anticuerpo de fago (o hibridoma humanizado) de la presente memoria, aunque, en algunas realizaciones, se usa el dominio constante ligero lambda. "CPA.7.518.1.H1" se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesado y ligero variables, incluyendo el dominio constante de IgG1 humana (por lo tanto, las secuencias de H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en la Figura 50). Por consiguiente, "CPA.7.518.1.H2" sería los dominios variables de CPA.7.518.1 unidos a IgG2 humana. "CPA.7.518.1.H3" sería los dominios variables de CPA.7.518.1 unidos a IgG3 humana, y "CPA.7.518.1.H4" sería los dominios variables de CPA.7.518.1 unidos a IgG4 humana. Obsérvese que, en algunos casos, las IgG humanas pueden tener mutaciones adicionales, tales como las descritas más adelante, y esto puede anotarse. Por ejemplo, en muchas realizaciones, puede haber una mutación S241P en la IgG4 humana, y esto puede anotarse como "CPA.7.518.1.H4(S241P)", por ejemplo. La secuencia de IgG4 humana en esta variante de bisagra S241P se muestra en la Figura 50. Otras variantes potenciales son IgG1(N297A), (u otras variantes que eliminan la glicosilación en este sitio y así muchas de las funciones efectoras asociadas con la unión a FcγRIIIa), e IgG1(D265A), que reduce la unión a los receptores FcγR.

La invención proporciona además dominios pesados y ligeros variables, así como cadenas pesadas y ligeras de longitud completa.

En algunas realizaciones, la invención proporciona scFv que se unen a PVRIG que comprenden un dominio pesado variable y un dominio ligero variable unidos por un conector scFv como se ha indicado anteriormente. Los dominios VL y VH pueden estar en cualquier orientación, p. ej., desde el extremo N al C "VH-conector-VL" o "VL-conector"VH". Estos se denominan por sus partes componentes; por ejemplo, "scFv-CH A.7.518.1 VH-conector-VL" o "scFv-CPA. 7.518.1.VL-conector-VH". Así, "scFv-CPA.7.518.1" puede estar en cualquier orientación.

IX. Ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos

También se proporcionan composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, así como vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos y células huésped transformadas con las composiciones de ácido nucleico y/o vector de expresión. Como apreciarán los expertos en la técnica, las secuencias de proteínas representadas en la presente memoria pueden estar codificadas por cualquier número posible de secuencias de ácido nucleico, debido a la degeneración del código genético.

Las composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos dependerán del formato del anticuerpo. Para los anticuerpos tetraméricos tradicionales que contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras están codificados por dos ácidos nucleicos diferentes, uno que codifica la cadena pesada y uno que codifica la cadena ligera. Estos pueden ponerse en un único vector de expresión o en dos vectores de expresión, como se sabe en la técnica, transformarse en células huésped, donde se expresan para formar los anticuerpos de la invención. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando se usan construcciones de scFv, se usa generalmente un único ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable-conector-cadena ligera variable, que puede insertarse en un vector de expresión para su transformación en células huésped. Los ácidos nucleicos pueden ponerse en vectores de expresión que contienen las secuencias de control de la transcripción y traducción apropiadas, incluyendo, pero no limitado a, secuencias señal y de secreción, secuencias reguladoras, promotores, orígenes de la replicación, genes de selección, etc.

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes según al menos algunas realizaciones de la invención incluyen de Ovario de Hámster Chino (células CHO), PER.C6, HEK293 y otras, como se sabe en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se convierte en sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeo CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras conocidas en la técnica.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen de forma operativa a otro fragmento que codifica un conector flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3 y otras discutidas en la presente memoria, de manera que las secuencias de V_H y V_L pueden expresarse como una proteína contigua de cadena única, con las regiones V_L y V_H unidas por el conector flexible.

X. Formulaciones

Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los métodos anteriores (y, en particular, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086) pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el método de administración deseado. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con la composición terapéutica, retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no es reactivo con el sistema inmune del paciente. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, cualquiera de varios vehículos farmacéuticos estándar, tales como disoluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática, y semejantes (véase, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, A. Osal., Ed., 1980). Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden incluir tampones.

En una realización preferida, la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención puede estar en una forma soluble en agua, tal como estando presente como sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluyan sales de adición tanto a ácido como a base. "Sal de adición a ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de otra forma indeseables, formadas con ácidos inorgánicos y semejantes. Las "sales de adición a base farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas y semejantes.

La administración de la composición farmacéutica que comprende anticuerpos de la presente invención, preferiblemente en la forma de una disolución acuosa estéril, puede hacerse de varias maneras, incluyendo, pero no limitado a, subcutáneamente e intravenosamente.

Las cantidades de la dosificación y la frecuencia de la administración, en una realización preferida, se seleccionan para ser terapéuticamente o profilácticamente efectivas. Como se sabe en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de las proteínas, administración sistémica frente a localizada, y tasa de nueva síntesis de proteasas, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de la administración, interacción entre fármacos y la gravedad de la afección, y lo averiguarán los expertos en la técnica con experimentación rutinaria.

Con el fin de tratar a un paciente, puede administrarse una dosis terapéuticamente efectiva de la variante de Fc de la presente invención. Por "dosis terapéuticamente efectiva" se quiere decir en la presente memoria una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y la podrán averiguar los expertos en la técnica usando técnicas conocidas.

XI. Métodos para usar los anticuerpos

Los anticuerpos de la invención, incluyendo tanto anticuerpos frente a PVRIG como frente a TIGIT, pueden usarse en varias aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. En algunos casos, la decisión de qué anticuerpo administrar a un paciente se toma usando una evaluación de los niveles de expresión (bien niveles de expresión génica o niveles de expresión de proteínas, prefiriéndose el último) de biopsias de muestras tumorales para determinar si la muestra sobreexpresa bien TIGIT o PVRIG, o ambos, para determinar qué anticuerpos terapéuticos administrar.

A. Usos diagnósticos

Por consiguiente, los anticuerpos de la invención también encuentran uso en el diagnóstico in vitro o in vivo, incluyendo imagenología de tumores que sobreexpresan bien PVRIG o TIGIT, respectivamente. Debe indicarse, sin embargo, que, como se discute en la presente memoria, tanto TIGIT como PVRIG, como proteína diana de la inmuno-oncología, no se sobreexpresan necesariamente en las células cancerosas, sino en los infiltrados inmunes en el cáncer. Así es el mecanismo de acción, p. ej., activación de las células inmunes, tales como las células T y las células NK, lo que da lugar al diagnóstico del cáncer. Por consiguiente, estos anticuerpos pueden usarse para diagnosticar el cáncer. El diagnóstico usando anticuerpos frente a PVRIG también se indica en WO 2016/134333, [0434 a 0459].

Generalmente, el diagnóstico puede hacerse de varias maneras. En una realización, un tejido de un paciente, tal como una muestra de biopsia, se pone en contacto con un anticuerpo frente a TIGIT, generalmente marcado, de manera que el anticuerpo se une al TIGIT endógeno. El nivel de la señal se compara con la del tejido no canceroso normal bien del mismo paciente o de una muestra de referencia, para determinar la presencia o ausencia de cáncer. La muestra de biopsia puede ser de un tumor sólido, una muestra de sangre (para linfomas y leucemias tales como ALL, linfoma de células T, etc).

En general, en esta realización, el anti-TIGIT está marcado, por ejemplo, con un fluoróforo u otro marcador óptico, que se detecta usando un fluorímetro u otro sistema de detección óptico, como se conoce bien en la técnica. En una realización alternativa, se pone en contacto un anticuerpo secundario marcado con la muestra, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IgG humana de un mamífero diferente (ratón, rata, conejo, cabra, etc.) para formar un ensayo en sándwich como se sabe en la técnica. Alternativamente, el mAb anti-TIGIT podría marcarse directamente (es decir, biotina) y la detección puede hacerse por un Ab secundario dirigido al agente de marcaje en la técnica.

Una vez se ha observado la sobreexpresión de TIGIT, el tratamiento puede continuar con la administración de un anticuerpo anti-TIGIT según la invención como se indica en la presente memoria.

En otros casos, se hace un diagnóstico in vivo. Generalmente, el anticuerpo anti-TIGIT (incluyendo fragmentos de anticuerpo) se inyecta en el paciente y se realiza imagenología. Por ejemplo, el anticuerpo se marca generalmente con un marcaje óptico o un marcaje de MRI, tal como un quelato de gadolinio, marcaje radiactivo de mAb (incluyendo fragmentos).

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, o solo para diagnóstico. Cuando los anticuerpos anti-TIGIT se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, algunas realizaciones se basan en dos anticuerpos anti-TIGIT diferentes frente a dos epítopos diferentes, de manera que el anticuerpo de diagnóstico no compite para la unión con el anticuerpo terapéutico, aunque, en algunos casos puede usarse para ambos el mismo anticuerpo. Por ejemplo, esto puede hacerse usando anticuerpos que están en diferentes clases, p. ej., que se unen a diferentes epítopos en TIGIT, tal como se indica en la presente memoria. Así, en la descripción se incluyen composiciones que comprenden un anticuerpo de diagnóstico y un anticuerpo terapéutico, y, en algunas realizaciones, el anticuerpo de diagnóstico se marca como se describe en la presente memoria. Además, la composición de anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico también puede coadministrarse con otros fármacos como se indica en la presente memoria.

Los anticuerpos particularmente útiles para uso en el diagnóstico incluyen, pero no están limitados a, aquellos anticuerpos enumerados, o anticuerpos que utilizan las CDR con secuencias variantes, o aquellos que compiten para la unión con cualquiera de los anticuerpos en la Figura 53.

En muchas realizaciones, un anticuerpo de diagnóstico se marca. Por "marcado" se quiere decir en la presente memoria que los anticuerpos descritos en la presente memoria tienen uno o más elementos, isótopos, o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un procedimiento de cribado o de diagnóstico. En general, los marcajes se encuentran en varias clases: a) marcajes inmunes, que pueden ser un epítopo incorporado como un compañero de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) marcajes isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, c) marcajes que son moléculas pequeñas, que pueden incluir agentes de tinción fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permiten otros métodos de marcaje, y d) marcajes tales como partículas (incluyendo burbujas para el marcaje por ultrasonidos) o marcajes paramagnéticos que permiten la imagenología corporal. Los marcajes pueden incorporarse en los anticuerpos en cualquier posición y pueden incorporarse in vitro o in vivo durante la expresión de la proteína, como se sabe en la técnica.

El diagnóstico puede hacerse bien in vivo, por la administración de un anticuerpo de diagnóstico que permite la imagenología de cuerpo completo como se describe más adelante, o in vitro, en muestras extraídas de un paciente. "Muestra", en este contexto, incluye cualquier número de cosas, incluyendo, pero no limitado a, fluidos corporales (incluyendo, pero no limitado a, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor y semen), así como muestras de tejidos, tales como el resultado de biopsias de tejidos relevantes.

Además, como se indica más adelante y en los Ejemplos y Figuras, puede usarse la información respecto a los niveles de expresión de la proteína bien de PVRIG o TIGIT, o ambos, o PVRIG y PD-1, o TIGIT y PD-1, para determinar qué anticuerpos deberían administrarse a un paciente.

B. Tratamiento del cáncer

Los anticuerpos de la invención encuentran un uso particular en el tratamiento del cáncer. En general, los anticuerpos de la invención son inmunomoduladores, ya que, en lugar de atacar directamente a las células cancerosas, los anticuerpos de la invención estimulan el sistema inmune, generalmente mediante la inhibición de la acción del receptor del punto de control (p. ej., PVRIG o TIGIT). Así, a diferencia de las terapias dirigidas al tumor, que tienen el objetivo de inhibir rutas moleculares que son cruciales para el crecimiento y desarrollo tumorales, y/o deplecionar las células tumorales, la inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo estimular el propio sistema inmune del paciente para eliminar las células cancerosas, proporcionando una destrucción tumoral duradera. Pueden usarse varias estrategias en la inmunoterapia del cáncer, entre ellas están las vacunas terapéuticas del cáncer para inducir respuestas de

células T específicas del tumor, y anticuerpos inmunoestimuladores (es decir, antagonistas de receptores inhibidores = puntos de control inmune) para eliminar las rutas inmunosupresoras.

Las respuestas clínicas con terapia dirigida o terapias anticancerosas convencionales tienden a ser transitorias ya que las células cancerosas desarrollan resistencia, y tiene lugar la recurrencia tumoral. Sin embargo, el uso clínico de la inmunoterapia del cáncer en los últimos años ha mostrado que este tipo de terapia puede tener respuestas clínicas duraderas, mostrando un impacto dramático en la supervivencia a largo plazo. Sin embargo, aunque las respuestas son duraderas, solo un pequeño número de pacientes responde (a diferencia de la terapia convencional o dirigida, donde un gran número de pacientes responde, pero las respuestas son transitorias).

Para cuando un tumor se detecta clínicamente, ya ha evadido el sistema de defensa inmune adquiriendo propiedades de inmunorresistencia e inmunosupresoras y creando un microentorno tumoral inmunosupresor a través de varios mecanismos y una variedad de células inmunes.

Por consiguiente, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar el cáncer. Debido a la naturaleza de un mecanismo de acción de inmuno-oncología, no es necesario que el receptor del punto de control (TIGIT o PVRIG) se sobreexprese en o se correlacione con un tipo de cáncer particular; esto es, el objetivo es tener los anticuerpos que eliminen la supresión de la activación de las células T y las células NK, de manera que el sistema inmune luchará contra los cánceres.

"Cáncer", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere ampliamente a cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva o metastásica) caracterizada por una división celular anormal e incontrolada que causa el crecimiento o tumor maligno (p. ej., crecimiento celular no regulado). El término "cáncer" o "canceroso", tal y como se usa en la presente memoria, debe entenderse que engloba cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva, no invasiva o metastásica) que se caracteriza por una división celular anormal e incontrolada que causa el crecimiento o tumor maligno, cuyos ejemplos no limitativos se describen en la presente memoria. Esto incluye cualquier afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer se ejemplifican en los ejemplos de trabajo y también se describen en la memoria descriptiva.

Los ejemplos no limitativos de cáncer que pueden tratarse usando los anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de células B (incluyendo linfoma no de Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de grado alto; NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células no escindidas pequeño de grado alto; NHL con enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; mieloma múltiple y trastorno linfoproliferativo después de trasplante (PTLD).

Como se muestra en los Ejemplos de WO2016/134333, PVRIG está sobreexpresado en y/o se correlaciona con la infiltración de linfocitos en los tumores (como se demuestra por la correlación con la expresión de CD3, CD4, CD8 y PD-1) en varios tumores diferentes de varios orígenes, y así es útil en el tratamiento de cualquier cáncer, incluyendo, pero no limitado a, cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (linfoma no de Hodgkin (NHL) y linfoma de Hodgkin (HD)), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, y cáncer esofágico.

En particular, CHA.7.518.1H4(S241P) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

En particular, CHA.7.538.1.2.H4(S241P) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de

estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

En particular, CPA.9.086H4(S241P) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

En particular, CPA.9.083H4(S241P) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

En particular, CHA.9.547.7.H4(S241P) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

En particular CHA.9.547.13.H4(S241P) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

C. Monoterapia con anticuerpos frente a TIGIT

Los anticuerpos frente a TIGIT de la invención encuentran un uso particular en el tratamiento del cáncer como una monoterapia. Debido a la naturaleza del mecanismo de acción de la inmuno-oncología, no es necesario que TIGIT se sobreexprese en o se correlacione con un tipo de cáncer particular; esto es, el objetivo es tener los anticuerpos anti-TIGIT que eliminen la supresión de la activación de las células T y las células NK, de manera que el sistema inmune luchará contra los cánceres.

Aunque cualquier anticuerpo anti-TIGIT de la Figura 53 encuentra uso en el tratamiento del cáncer (incluyendo la activación de las células T como se indica más adelante), CPA.9.086.H4(S241P), CPA.9.083.H4(S241P), CHA.9.547.7.H4(S241P), y CHA.9.547.13.H4(S241P), encuentran un uso particular en algunas realizaciones.

D. Monoterapia con anticuerpos frente a PVRIG

Los anticuerpos frente a PVRIG de la invención encuentran un uso particular en el tratamiento del cáncer como una monoterapia. Debido a la naturaleza del mecanismo de acción de la inmuno-oncología, no es necesario que TIGIT se sobreexprese en o se correlacione con un tipo de cáncer particular; esto es, el objetivo es tener los anticuerpos anti-TIGIT que eliminen la supresión de la activación de las células T y las células NK, de manera que el sistema inmune luchará contra los cánceres.

En particular, CHA.7.518.1 H4(S241 P) encuentra uso como una monoterapia.

De forma similar, en particular, CHA.7.538.1.2.H4(S241P) encuentra uso como una monoterapia, en el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel distinto de melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células B grande difuso, tumores de células germinales testiculares, mesotelioma, cáncer de vejiga y cáncer esofágico.

E. Terapias de combinación

Como se sabe en la técnica, las terapias de combinación que comprenden un anticuerpo terapéutico dirigido a una diana de inmunoterapia y un agente terapéutico adicional, específico para la afección patológica, están siendo muy prometedoras. Por ejemplo, en el área de la inmunoterapia, hay varias terapias de combinación prometedoras que usan un agente quimioterapéutico (bien un fármaco que es una molécula pequeña o un anticuerpo antitumoral) o con un anticuerpo de inmuno-oncología.

Los términos "en combinación con" y "coadministración" no están limitados a la administración de dichos agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo. En su lugar, se quiere decir que el anticuerpo y el otro agente o agentes se administran en una secuencia y en un intervalo de tiempo, de manera que pueden actuar conjuntamente para proporcionar un beneficio que se incrementa frente al tratamiento solo con cualquiera del anticuerpo de la presente invención o el otro agente o agentes. Se prefiere que el anticuerpo y el otro agente o agentes actúen de forma aditiva, y se prefiere especialmente que actúen de forma sinérgica. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido. El médico experto puede determinar empíricamente, o considerando la farmacocinética y modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como los esquemas temporales y los métodos de administración apropiados.

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse concomitantemente con uno o más regímenes o agentes terapéuticos distintos. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para mejorar la eficacia o la seguridad del anticuerpo. También, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para tratar la misma enfermedad o una comorbilidad en lugar de alterar la acción del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o tanto quimioterapia como terapia de radiación.

1. Anticuerpos frente a TIGIT con moléculas pequeñas quimioterapéuticas

Los anticuerpos frente a TIGIT de la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos, incluyendo, pero no limitado a, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de proteínas tirosina quinasas (PTK), u otros agentes terapéuticos.

En este contexto, un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida, sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL'); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloruro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall y caliqueamicina omegall (véase, p. ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomofolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenérgicos, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina;

PSK.RTM. complejo de polisacáridos (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretán; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE®, sin cremophor, formulación de nanopartículas de albúmina preparada por ingeniería de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, I11.), y docetaxel (TAXOTERE®; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZARM®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, y prednisolona; CVP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN®) combinado con 5-FU y leucovorina.

Según al menos algunas realizaciones, las moléculas inmunes anti-TIGIT podrían usarse en combinación con cualquiera de los estándares de cuidado para el cáncer conocidos en la técnica (como pueden encontrarse, por ejemplo, en http://www.cancer.gov/cancertopics).

Así, en algunos casos, los anticuerpos anti-PVRIG indicados en la presente memoria (particularmente, incluyendo CHA.7.538.1.2.H4(S241P) o CHA.7.518.1.H4(S241P)) pueden combinarse con agentes quimioterapéuticos. De forma similar, los anticuerpos anti-TIGIT indicados en la presente memoria (particularmente, incluyendo CPA.9.086H4(S241P), CPA.9.083H4(S241P) y CHA.9.547.13.H4(S241P)) pueden combinarse con agentes quimioterapéuticos.

Además, los anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT de la invención también pueden administrarse con otros inhibidores o activadores del punto de control.

2. Terapia de combinación de anticuerpo frente a TIGIT y punto de control

Como se muestra en la presente memoria, los anticuerpos frente a TIGIT de la invención pueden combinarse con uno de varios anticuerpos frente a receptores del punto de control. En algunas realizaciones, el tumor de un paciente puede evaluarse para determinar la expresión de receptores y los resultados se usan entonces para informar a un médico respecto a qué anticuerpos administrar: PVRIG y PD-1, TIGIT y PD-1 o TIGIT y PVRIG. Estos ensayos se describen más adelante.

a. Anticuerpos anti-TIGIT en combinación con anticuerpos anti-PD-1

En una realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-PD-1.

En una realización, se toma una biopsia de un tumor de un paciente con cáncer, y se disocia como se sabe en la técnica para análisis por FACS. Las células se tiñen con anticuerpos marcados frente a (1) TIGIT (por ejemplo, usando cualquiera descrito en la presente memoria u otros en la técnica, tales como MBSA43); (2) PD-1 (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, incluyendo EH12.2H7, Keytruda®, Opdivo®, etc.); (3) PD-L1 (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, tales como BM-1 indicado en la presente memoria) y (4) PVR (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, tales como SKII.4); y (5) un anticuerpo de control de isotipo. Se realiza FACS y, para cada receptor, se calcula el porcentaje de las células que expresa el receptor respecto al anticuerpo control. Si el porcentaje de células positivas para TIGIT, PD-1, PD-1 y PVR es ≥ 1% para los 4 receptores, entonces el paciente se trata con anticuerpos frente a TIGIT y PD-1 como se indica en la presente memoria.

Por consiguiente, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-PD-1. Hay dos anticuerpos anti-PD-1 aprobados, pembrolizumab (Keytruda®) y nivolumab (Opdivo®) y muchos más en desarrollo que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) (como se muestra en la Figura 53B) con pembrolizumab; CPA.9.083.H4(S241P) como se muestra en la Figura 53B con nivolumab; CPA.9.086.H4(S241P) como se muestra en la Figura 53A con pembrolizumab; CPA.9.086.H4(S241P) como se muestra en la Figura 53A con nivolumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con pembrolizumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con nivolumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con pembrolizumab y CHA.9.547.13.H4(S241P) con nivolumab. (Se hace referencia al listado de secuencias).

b. Anticuerpos anti-TIGIT en combinación con anticuerpos anti-CTLA-4

En otra realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-CTLA-4. Hay dos anticuerpos anti-CTLA-4 aprobados, ipilimumab (Yervoy®), y tremelimumab, así como otros en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con ipilimumab; CPA.9.083.H4(S241P) con tremelimumab; CPA.9.086.H4(S241P) con ipilimumab; CPA.9.086.H4(S241P) con tremelimumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con ipilimumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con tremelimumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con ipilimumab y CHA.9.547.13.H4(S241P) con tremelimumab.

c. Anticuerpos anti-TIGIT en combinación con anticuerpos anti-PD-L1

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la descripción y anticuerpos anti-PD-L1. Hay tres anticuerpos anti-PD-L1 aprobados, atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®), y durvalumab (IMFINZI™), así como otros anticuerpos anti-PD-L1 en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la descripción.

Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con atezolizumab; CPA.9.083.H4(S241P) con avelumab; CPA.9.083.H4(S241P) con durvalumab; CPA.9.086.H4(S241P) con atezolizumab; CPA.9.086.H4(S241P) con avelumab; CPA.9.086.H4(S241P) con durvalumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con atezolizumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con avelumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con durvalumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con atezolizumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con avelumab; y CHA.9.547.13.H4(S241P) con durvalumab.

d. Anticuerpos anti-TIGIT en combinación con anticuerpos anti-LAG-3

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-LAG-3. Hay varios anticuerpos anti-LAG-3 en desarrollo, incluyendo BMS-986016 (véase la Solicitud de Patente Internacional No. WO2010/019570A2), GSK2831781 (véase la Solic. de Patente de EE. UU. No. 2016/0017037A), y los clones de Merck 22D2, 11C9, 4A10, y/o 19E8 (véase, WO2016/028672A1) y GSK2831781, así como otros en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con BMS-986016; CPA.9.083.H4(S241P) con GSK2831781; CPA.9.086.H4(S241P) con BMS-986016; CPA.9.086.H4(S241P) con GSK2831781; CHA.9.547.7H4(S241P) con BMS-986016; CHA.9.547.7H4(S241P) con GSK2831781; CHA.9.547.13.H4(S241P) con BMS-986016 y CHA.9.547.13.H4(S241P) con GSK2831781.

Por consiguiente, la descripción también proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9, y/o 4A10; CPA.9.086.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9, y/o 4A10; CHA.9.547.7H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9, y/o 4A10; CHA.9.547.13.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9, y/o 4A10.

e. Anticuerpos anti-TIGIT en combinación con anticuerpos anti-TIM-3

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-TIM-3. Hay al menos un anticuerpo anti-TIM-3 en desarrollo, TSR-022, así como otros en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con TSR-022; CPA.9.086.H4(S241P) con TSR-0226; CHA.9.547.7H4(S241P) con TSR-022; y CHA.9.547.13.H4(S241P) con TSR-022.

f. Anticuerpos anti-TIGIT en combinación con anticuerpos anti-BTLA

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-BTLA, véase, WO2011/014438, y particularmente para las CDR y las secuencias de longitud completa de los anticuerpos anti-BTLA descritos en ella. Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA; CPA.9.086.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA; CHA.9.547.7H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA; y CHA.9.547.13.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA.

g. Anticuerpos frente a TIGIT con anticuerpos antitumorales

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se coadministran con anticuerpos que, a diferencia de la inmuno-oncología/inhibidores de puntos de control que, generalmente, actúan sobre el sistema inmune para incrementar la respuesta inmune nativa del paciente, están dirigidos en cambio frente a un antígeno diana específico del tumor (TTA). Hay un amplio número de anticuerpos anti-TTA bien aprobados o en desarrollo que pueden combinarse con los presentes anticuerpos frente a TIGIT. Los anticuerpos aprobados actualmente incluyen, pero no están limitados a, cetuximab, panitumumab, nimotuzumab (todos frente a EGFR), rituximab (CD20), trastuzumab y pertuzumab (HER2), alemtuzumab (CD52), bevacizumab (VEGF), ofatumumab (CD20), denosumab (ligando de

RANK), brentuximab (CD30), daratumumab (CD38), ibritumomab (CD20) e ipilimumab (CTLA-4). Loa anticuerpos de oncología específicos de diana en los ensayos clínicos que pueden combinarse con los anticuerpos anti-TIGIT de la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, mAb anti-CTLA4, tales como ipilimumab, tremelimumab; anti-PD-1, tales como nivolumab BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, AMP224, CT-011, MK-3475, antagonistas anti-PDL-1, tales como BMS-936559/MDX-1105, MEDI4736, RG-7446/MPDL3280A; anti-LAG-3, tales como IMP-321), anti-TIM-3, anti-BTLA, anti-B7-H4, anti-B7-H3, anti-VISTA; anticuerpos agonistas dirigidos a proteínas inmunoestimuladoras, incluyendo mAb anti-CD40, tales como CP-870,893, lucatumumab, dacetuzumab; mAb anti-CD137, tales como BMS-663513 urelumab (anti-4-1BB; véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 7.288.638 y 8.962.804); PF-05082566 utomilumab (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 8.821.867; 8.337.850; y 9.468.678, así como la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2012/032433); mAb anti-OX40, tales como anti-OX40 (véanse, por ejemplo, WO2006/029879 o WO2010096418); mAb anti-GITR, tales como TRX518 (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. No. 7.812.135); mAb anti-CD27, tales como varlilumab CDX-1127 (véanse, por ejemplo, WO 2016/145085 y las Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. US 2011/0274685 y US 2012/0213771), mAb anti-ICOS (por ejemplo, MEDI-570, JTX-2011, y anticuerpos anti-TIM3 (véanse, por ejemplo, WO 2013/006490 o la Solicitud de Patente de EE. UU. No US 2016/0257758), así como anticuerpos monoclonales frente al cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer endometrial, mieloma múltiple, melanoma, linfomas, cánceres de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, (véase, generalmente www.clinicaltrials.gov).

3. Terapia de combinación de PVRIG y PD-1

Como se muestra en la presente memoria, los anticuerpos frente a PVRIG de la invención pueden combinarse con uno de un número de anticuerpos frente a receptores de puntos de control.

a. Anticuerpos anti-PVRIG en combinación con anticuerpos anti-PD-1

En otra realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-PD-1.

En una realización, se toma una biopsia de un tumor de un paciente con cáncer, y se disocia como se sabe en la técnica para análisis por FACS. Las células se tiñen con anticuerpos marcados frente a (1) PVRIG (generalmente usando CHA.7.518.1H4(S241P), por ejemplo, aunque puede usarse cualquiera indicado en WO2016/134333 (específicamente incluyendo cualquiera que se una, incluso si no bloquean) o WO2017/041004)); (2) PD-1 (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, incluyendo EH12.2H7, Keytruda®, Opdivo®, etc.); (3) PD-L1 (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, tales como BM-1 indicado en la presente memoria) y (4) PVRL2 (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, tales como TX11); y (5) un anticuerpo de control de isotipo. Se realiza FACS y, para cada receptor, se calcula el porcentaje de las células que expresa el receptor respecto al anticuerpo control. Si el porcentaje de células positivas para PVRIG, PD-1, PD-1 y PVRL2 es ≥ 1% para los 4 receptores, entonces el paciente se trata con anticuerpos frente a PVRIG y PD-1 como se indica en la presente memoria.

Hay dos anticuerpos anti-PD-1 aprobados, pembrolizumab (Keytruda®) y nivolumab (Opdivo®) y muchos más en desarrollo que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-PVRIG de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) (como se muestra en la Figura 3) con pembrolizumab; CHA.7.518.1.H4(S241P) como se muestra en la Figura 3 con nivolumab; CHA.7.538.1.2. H4(S241P) como se muestra en la Figura 3 con pembrolizumab y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) como se muestra en con nivolumab.

b. Anticuerpos anti-PVRIG en combinación con anticuerpos anti-CTLA-4

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-CTLA-4. Hay dos anticuerpos anti-CTLA-4 aprobados, ipilimumab (Yervoy®), y tremelimumab, así como otros en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con ipilimumab; CHA.7.518.1.H4(S241P) con tremelimumab; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con ipilimumab y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con tremelimumab.

c. Anticuerpos anti-PVRIG en combinación con anticuerpos anti-PD-L1

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-PD-L1. Hay tres anticuerpos anti-PD-L1 aprobados, atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®), y durvalumab, así como otros anticuerpos anti-PD-L1 en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con atezolizumab; CPA.7518.1.H4(S241P) con avelumab; CHA.7.518.1.H4(S241P) con durvalumab;

CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con atezolizumab; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con avelumab y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con durvalumab.

d. Anticuerpos anti-PVRIG en combinación con anticuerpos anti-LAG-3

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-LAG-3. Hay varios anticuerpos anti-LAG-3 en desarrollo, incluyendo BMS-986016 (véase WO2010/019570A2), GSK2831781 (véase la Solic. de Patente de EE. UU. No. 2016/0017037A), y los clones de Merck 22D2, 11C9, 4A10, y/o 19E8 {véase, WO2016/028672A1) y GSK2831781, así como otros en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-PVRIG de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con BMS-986016; CHA.7.518.1.H4(S241P) con GSK2831781; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con BMS-986016 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con GSK2831781.

Por consiguiente, la descripción también proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9, y/o 4A10 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9, y/o 4A10.

e. Anticuerpos anti-PVRIG en combinación con anticuerpos anti-TIM-3

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-TIM-3. Hay al menos un anticuerpo anti-TIM-3 en desarrollo, TSR-022, así como otros en desarrollo, que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-PVRIG de la invención.

Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con TSR-022 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con TSR-0226.

f. Anticuerpos anti-PVRIG en combinación con anticuerpos anti-BTLA

En otra realización, la descripción proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-BTLA, véase WO2011/014438 y, particularmente, para las CDR y las secuencias de longitud completa de los anticuerpos anti-BTLA descritos en ella. Por consiguiente, la descripción proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA.

g. Anticuerpos frente a PVRIG con anticuerpos antitumorales

En algunos casos, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se coadministran con anticuerpos que, a diferencia de la inmuno-oncología/inhibidores de puntos de control que, generalmente, actúan sobre el sistema inmune para incrementar la respuesta inmune nativa del paciente, están dirigidos en cambio frente a un antígeno diana específico del tumor (TTA). Hay un amplio número de anticuerpos anti-TTA bien aprobados o en desarrollo que pueden combinarse con los presentes anticuerpos frente a PVRIG, incluyendo CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Los anticuerpos aprobados actualmente incluyen, pero no están limitados a, cetuximab, panitumumab, nimotuzumab (todos frente a EGFR), rituximab (CD20), trastuzumab y pertuzumab (HER2), alemtuzumab (CD52), bevacizumab (VEGF), ofatumumab (CD20), denosumab (ligando de RANK), brentuximab (CD30), daratumumab (CD38), ibritumomab (CD20) e ipilimumab (CTLA-4). los anticuerpos de oncología específicos de diana en ensayos clínicos que pueden combinarse con los anticuerpos anti-PVRIG de la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, mAb anti-CTLA4, tales como ipilimumab, tremelimumab; anti-PD-1, tales como nivolumab BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, AMP224, CT-011, MK-3475, antagonistas anti-PDL-1, tales como BMS-936559/MDX-1105, MEDI4736, RG-7446/MPDL3280A; anti-LAG-3, tales como IMP-321), anti-TIM-3, anti-BTLA, anti-B7-H4, anti-B7-H3, anti-VISTA; anticuerpos agonistas dirigidos a proteínas inmunoestimuladoras, incluyendo mAb anti-CD40, tales como CP-870,893, lucatumumab, dacetuzumab; mAb anti-CD137, tales como BMS-663513 urelumab (anti-4-1BB; véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 7.288.638 y 8.962.804); PF-05082566 utomilumab (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 8.821.867; 8.337.850; y 9.468.678, así como la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2012/032433); mAb anti-OX40, tales como anti-OX40 (véanse, por ejemplo, WO2006/029879 o WO2010096418); mAb anti-GITR, tales como TRX518 (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. No. 7.812.135); mAb anti-CD27, tales como varlilumab CDX-1127 (véanse, por ejemplo, WO 2016/145085 y las Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. US 2011/0274685 y US 2012/0213771), mAb anti-ICOS (por ejemplo, MEDI-570, JTX-2011, y anticuerpos anti-TIM3 (véanse, por ejemplo, WO 2013/006490 o la Publicación de Patente de EE. UU. No US 2016/0257758), así como anticuerpos monoclonales frente al cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer endometrial, mieloma múltiple, melanoma, linfomas, cánceres de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, (véase, generalmente, www.clinicaltrials.gov).

4. Terapia de combinación de PVRIG y TIGIT

Hay combinaciones específicas de anticuerpos anti-TIGIT y anti-PVRIG que encuentran uso en realizaciones particulares.

En un caso, se toma una biopsia de un tumor de un paciente con cáncer, y se disocia como se sabe en la técnica para análisis por FACS. Las células se tiñen con anticuerpos marcados frente a (1) PVRIG (generalmente usando CHA.7.518.1H4(S241P), por ejemplo, aunque puede usarse cualquiera indicado en WO2016/134333 (específicamente incluyendo cualquiera que se una, incluso si no bloquean) o WO2017/041004)); (2) TIGIT (por ejemplo, usando cualquiera descrito en la presente memoria u otros en la técnica, tal como MBSA43); (3) PVR (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, tal como SKII.4) y (4) PVRL2 (por ejemplo, usando aquellos conocidos en la técnica, tal como TX11); y (5) un anticuerpo de control de isotipo. Se realiza FACS y, para cada receptor, se calcula el porcentaje de las células que expresa el receptor respecto al anticuerpo control. Si el porcentaje de células positivas para PVRIG, TIGIT, PVR y PVRL2 es ≥ 1% para los 4 receptores, entonces el paciente se trata con anticuerpos frente a PVRIG y TIGIT. Las combinaciones preferidas a este respecto son CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086.

En un caso, se combinan anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 con anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En un caso particular, se combinan anticuerpos que contienen las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 con anticuerpos que contienen las VL y VL del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En un caso, se combina CPA.9.086.H4(S241P) como se muestra en la Figura 53 con CHA.7.518.1H4(S241P) como se muestra en la Figura 3.

En un caso, se combinan anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 con anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En un caso particular, se combinan anticuerpos que contienen las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 con anticuerpos que contienen las VL y VL del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En un caso, se combina CPA.9.086.H4(S241P) con CHA.7.518.1H4(S241P).

En un caso, se combinan anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 con anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.538.1.2.H4(S241P). En un caso particular, se combinan anticuerpos que contienen las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 con anticuerpos que contienen las VL y VL del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.538.1.2.H4(S241P). En un caso, se combina CPA.9.086.H4(S241P) con CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

En un caso, se combina CHA.518.1.H4(S241P) con un anticuerpo anti-TIGIT como se lista en el listado de secuencias (con referencia a todos los anticuerpos listados en la Figura 4 de USSN 62/513.916), específicamente CPA.9.018, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.546.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3. CHA.9.541.4. CHA.9.541.5, CHA.9.541.6. CHA.9.541.7 y CHA.9.541.8.

En un caso, se combina CPA.9.086 con un anticuerpo anti-PVRIG como se indica en WO2017/041004, incluyendo, pero no limitado a, aquellos que tienen a) una secuencia de HC de la SEQ ID NO:5 y secuencia de LC de la SEQ ID NO:3 (o los conjuntos de CDR contenidos en ella) b) una secuencia de HC de la SEQ ID NO:32 y secuencia de LC de la SEQ ID NO:33 (o los conjuntos de CDR contenidos en ella); y c) una secuencia de HC de la SEQ ID NO:32 y secuencia de LC de la SEQ ID NO:40 (o los conjuntos de CDR contenidos en ella).

En algunos casos, la combinación comprende un anticuerpo anti-TIGIT seleccionado del grupo que consiste en CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7, y CHA.9.547.13 y el anticuerpo frente a PVRIG se selecciona del grupo que consiste en CHA7.518.1 y CHA.7.538.1.2. En algunos casos, la combinación comprende un anticuerpo anti-TIGIT seleccionado del grupo que consiste en CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7, y CHA.9.547.13 y el anticuerpo frente a PVRIG es CHA7.518.1. En algunos casos, la combinación comprende un anticuerpo anti-TIGIT seleccionado del grupo que consiste en CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7, y CHA.9.547.13 y el anticuerpo frente a PVRIG es CHA7.538.1.2. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.518.1. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.518.1. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.7 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.518. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.13 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.518.1. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.538.1.2. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.538.1.2. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.7 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.538.1.2. En algunos casos, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.13 y el anticuerpo frente a PVRIG CHA7.538.1.2.

Las Figuras 20-24 proporcionan anticuerpos frente a PVRIG, como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 15/277.978, presentada el 27 de septiembre, 2016. Los anticuerpos frente a TIGIT de la presente

invención pueden usarse en combinación con los anticuerpos frente a PVRIG como se describe en estas figuras, así como aquellos descritos a lo largo de esta solicitud.

5. Evaluación del tratamiento

Generalmente, los anticuerpos de la invención, solos o en combinación (PVRIG con PD-1, TIGIT con PD-1 o TIGIT con PVRIG) se administran a pacientes con cáncer, y se evalúa la eficacia de varias maneras, como se describe en la presente memoria. Así, aunque pueden operarse ensayos de eficacia estándar, tal como carga de cáncer load, tamaño del tumor, evaluación de la presencia o grado de metástasis, etc., los tratamientos inmuno-oncológicos también pueden evaluarse sobre la base de evaluaciones del estado inmune. Esto puede hacerse de varias maneras, incluyendo tanto ensayos in vitro como in vivo. Por ejemplo, puede hacerse la evaluación de los cambios en el estado inmune (p. ej., presencia de células T ICOS+ CD4+ después del tratamiento ipi) junto con mediciones "tradicionales", tales como carga tumoral, tamaño, capacidad de invasión, implicación de LN, metástasis, etc. Así, puede evaluarse cualquiera o todos de los siguientes: los efectos inhibidores de PVRIG o TIGIT en la activación o proliferación de las células T $CD4^+$, activación o proliferación de las células T $CD8^+$ (CTL), actividad citotóxica mediada por las células T $CD8^+$ y/o depleción celular mediada por CTL, actividad de las células NK y depleción celular mediada por NK, los efectos potenciadores de PVRIG o TIGIT en la diferenciación y proliferación de células Treg e inmunosupresión o tolerancia inmune mediada por Treg o células supresoras derivadas de mieloide (MDSC), y/o los efectos de PVRIG o TIGIT en la producción de citoquinas proinflamatorias por las células inmunes, p. ej., producción de IL-2, IFN-γ o TNF-α por las células T o u otras células inmunes.

En algunas realizaciones, la evaluación del tratamiento se hace evaluando la proliferación de las células inmunes, usando, por ejemplo, el método de dilución de CFSE, tinción intracelular de Ki67 de células efectoras inmunes, y el método de la incorporación de 3H-Timidina.

En algunas realizaciones, la evaluación del tratamiento se hace evaluando el incremento en la expresión génica o niveles de proteínas incrementados de marcadores asociados a la activación, incluyendo uno o más de: CD25, CD69, CD137, ICOS, PD1, GITR, OX40, y desgranulación celular medida por la expresión en la superficie de CD107A.

En algunas realizaciones, la evaluación del tratamiento se hace evaluando la cantidad de proliferación de las células T en ausencia de tratamiento, por ejemplo, antes de la administración de los anticuerpos de la invención. Si, después de la administración, el paciente tiene un incremento en la proliferación de las células T, p. ej., un subconjunto de las células T del paciente está proliferando, esto es una indicación de que las células T han sido activadas.

De forma similar, la evaluación del tratamiento con los anticuerpos de la invención puede hacerse midiendo los niveles de IFNγ del paciente antes de la administración y después de la administración para evaluar la eficacia del tratamiento. Esto puede hacerse en horas o días.

En general, los ensayos de la expresión génica se hacen como se sabe en la técnica. Véase, por ejemplo, Goodkind et al., Computers and Chem. Eng. 29(3):589 (2005), Han et al., Bioinform. Biol. Insights 11/15/15 9(Supl. 1):29-46, Campo et al., Nod. Pathol. 2013 ene; 26 supl. 1:S97-S110.

En general, las mediciones de la expresión de proteínas se hacen también de forma similar como se sabe en la técnica, véase, por ejemplo, Wang et al., Recent Advances in Capillary Electrophoresis-Based Proteomic Techniques for Biomarker Discovery, Methods. Mol. Biol. 2013:984: 1-12; Taylor et al, BioMed Res. Volumen 2014, ID del Artículo 361590, 8 páginas, Becerk et al., Mutat. Res 2011 junio 17:722(2): 171-182.

En algunas realizaciones, la evaluación del tratamiento se hace evaluando la actividad citotóxica medida por la detección de la viabilidad de la célula diana a través de la estimación de numerosos parámetros celulares, tales como actividad enzimática (incluyendo actividad proteasa), permeabilidad de la membrana celular, adherencia celular, producción de ATP, producción de coenzimas, y actividad de captación de nucleótidos. Los ejemplos específicos de estos ensayos incluyen, pero no están limitados a, tinción con azul de tripán o PI, método de liberación de ^{51}Cr o ^{35}S, actividad LDH, ensayos MTT y/o WST, ensayo de Calceína-AM, ensayo basado en luminiscencia, y otros.

En algunas realizaciones, la evaluación del tratamiento se hace evaluando la actividad de las células T medida por la producción de citoquinas, medida intracelularmente en el sobrenadante del cultivo usando citoquinas incluyendo, pero no limitado a, IFNγ, TNFα, GM-CSF, IL2, IL6, IL4, IL5, IL10, IL13 usando técnicas muy conocidas.

Por consiguiente, la evaluación del tratamiento puede hacerse usando ensayos que evalúan uno o más de los siguientes: (i) incrementos en la respuesta inmune, (ii) incrementos en la activación de las células T αβ y/o γδ, (iii) incrementos en la actividad de las células T citotóxicas, (iv) incrementos en la actividad de las células NK y/o NKT, (v) alivio de la supresión de las células T αβ y/o γδ, (vi) incrementos en la secreción de citoquinas proinflamatorias, (vii) incrementos en la secreción de IL-2; (viii) incrementos en la producción de interferón-γ, (ix) incrementos en la respuesta Th1, (x) disminuciones en la respuesta Th2, (xi) disminución o eliminación del número y/o actividad de células de al menos una de las células T reguladoras (Treg).

Ensayos para medir la eficacia

En algunas realizaciones, la activación de las células T se evalúa usando un ensayo de Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR) como se describe en los Ejemplos. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la respuesta inmune según se mide para un ejemplo por fosforilación o desfosforilación de diferentes factores, o midiendo otras modificaciones posteriores a la traducción. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la activación de las células T αβ y/o γδ según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación, como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la actividad de las células T citotóxicas según se mide para un ejemplo por la muerte directa de células diana como, por ejemplo, células cancerosas o por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la actividad de las células NK y/o NKT según se mide para un ejemplo por la muerte directa de células diana como, por ejemplo, células cancerosas o por la secreción de citoquinas o por cambios en la expresión de marcadores de activación como, por ejemplo, CD107a, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la supresión de las células T αβ y/o γδ, según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la secreción de citoquinas proinflamatorias según se mide, por ejemplo, por ELISA o por Luminex o por métodos basados en lechos Multiplex o por tinción intracelular y análisis por FACS o por Alispot etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la secreción de IL-2 según se mide, por ejemplo, por ELISA o por Luminex o por métodos basados en lechos Multiplex o por tinción intracelular y análisis por FACS o por Alispot etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la producción de interferón-γ según se mide, por ejemplo, por ELISA o por Luminex o por métodos basados en lechos Multiplex o por tinción intracelular y análisis por FACS o por Alispot etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la respuesta Th1 según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por cambios en la expresión de marcadores de activación. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la respuesta Th2 según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por cambios en la expresión de marcadores de activación. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones del número y/o actividad de células de al menos una de células T reguladoras (Treg), según se mide, por ejemplo, por citometría de flujo o por IHC. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las diminuciones apropiadas son las mismas que para los incrementos, indicados más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en los números de células de macrófagos M2, según se mide, por ejemplo, por citometría de flujo o por IHC. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las diminuciones apropiadas son las mismas que para los incrementos, indicados más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la actividad protumorogénica de los macrófagos M2, según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por cambios

en la expresión de marcadores de activación. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las diminuciones apropiadas son las mismas que para los incrementos, indicados más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en el incremento de neutrófilos N2, según se mide, por ejemplo, por citometría de flujo o por IHC. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las diminuciones apropiadas son las mismas que para los incrementos, indicados más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la actividad protumorogénica de los neutrófilos N2, según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por cambios en expresión de marcadores de activación. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las diminuciones apropiadas son las mismas que para los incrementos, indicados más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la inhibición de la activación de las células T, según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación, como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la inhibición de la activación de CTL según se mide para un ejemplo por la muerte directa de células diana como, por ejemplo, células cancerosas o por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación, como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en el agotamiento de las células T αβ y/o γδ según se mide para un ejemplo por cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las diminuciones apropiadas son las mismas que para los incrementos, indicados más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la respuesta de las células T αβ y/o γδ según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación, como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la estimulación de respuestas de memoria específicas de antígeno según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación, como por ejemplo CD45RA, CCR7 etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la apoptosis o lisis de células cancerosas según se mide para un ejemplo por ensayos citotóxicos, tales como, por ejemplo, MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o ensayos basados en citometría de flujo como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la estimulación del efecto citotóxico o citostático en células cancerosas, según se mide para un ejemplo por ensayos citotóxicos, tales como, por ejemplo, MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o ensayos basados en citometría de flujo como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la muerte directa de células cancerosas según se mide para un ejemplo por ensayos citotóxicos, tales como, por ejemplo, MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o ensayos basados en citometría de flujo como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio etc. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la actividad Th17 según se mide para un ejemplo por la secreción de citoquinas o por proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación. Un incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, el ensayo de la ruta de señalización mide incrementos o disminuciones en la inducción de la citotoxicidad dependiente del complemento y/o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, según se mide para un ejemplo por ensayos citotóxicos, tales como, por ejemplo, MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o ensayos basados en citometría de flujo como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio etc. Un

incremento en la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los incrementos apropiados en la actividad se indican más adelante.

En una realización, la activación de las células T se mide para un ejemplo por la muerte directa de células diana como, por ejemplo, células cancerosas o por la secreción de citoquinas o por la proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación, como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Para las células T, los incrementos en la proliferación, marcadores de activación de la superficie celular (p. ej., CD25, CD69, CD137, PD1), citotoxicidad (capacidad para matar a las células diana), y producción de citoquinas (p. ej., IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNF-α, IL-10, IL-17A) sería indicativo de modulación inmune que sería consistente con la muerte aumentada de las células cancerosas.

En una realización, la activación de las células NK se mide, por ejemplo, por la muerte directa de células diana como, por ejemplo, células cancerosas o por la secreción de citoquinas o por cambios en la expresión de marcadores de activación como, por ejemplo, CD 107a, etc. Para las células NK, los incrementos en la proliferación, citotoxicidad (capacidad para matar a las células diana e incrementos en la expresión de CD107a, granzima, y perforina), producción de citoquinas (p. ej., IFNγ y TNFα), y la expresión de receptores en la superficie celular (p. ej., CD25) sería indicativo de modulación inmune que sería consistente con la muerte aumentada de las células cancerosas.

En una realización, la activación de las células T γδ se mide, por ejemplo, por la secreción de citoquinas o por proliferación o por cambios en la expresión de marcadores de activación.

En una realización, la activación de las células Th1 se mide, por ejemplo, por la secreción de citoquinas o por cambios en la expresión de marcadores de activación.

Los incrementos apropiados en la actividad o respuesta (o disminuciones, según sea apropiado, como se ha indicado anteriormente), son incrementos de al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 a 99 % por ciento sobre la señal bien en una muestra de referencia o en muestras control, por ejemplo, muestras de ensayo que no contienen un anticuerpo anti-PVRIG de la invención. Los incrementos específicos en la actividad se representan en la Figura 27 a 34. Por ejemplo, con respecto a los incrementos en la proliferación de las células T, CHA.7.518.1.H4(S241P) muestra un incremento de aproximadamente un 60 % y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) muestra un incremento del 47 %; los incrementos relevantes se muestran bien en la proliferación de las células T o IFN-γ de aproximadamente un 10 a un 70 %, encontrando también uso de aproximadamente un 20 a un 60 %.

De forma similar, los incrementos de al menos una, dos, tres, cuatro o cinco veces en comparación con muestras de referencia o control muestran eficacia.

XIII. Ejemplos

A. Ejemplo 1: estudios de resonancia de plasmón superficial de la unión de PVR, PVRL2, y PVRL3 a PVRIG, DNAM, y TIGIT

Materiales y Métodos

Todos los experimentos se realizaron usando un instrumento ProteOn XPR 36 a 22 °C.

Etapa 1: se preparó una superficie de anticuerpo policlonal anti-fc humano de cabra de alta densidad (Invitrogen H10500) sobre seis carriles de un chip de GLC usando un biosensor ProteOn XPR 36. La etapa de activación para la superficie de anti-fc humano ocurrió en la dirección del flujo horizontal mientras que la etapa de inmovilización para el pAb de alta densidad ocurrió en la dirección del flujo vertical. La etapa de bloqueo ocurrió tanto en las posiciones vertical como horizontal, de manera que los "puntos intermedios" horizontales podrían usarse como superficies de referencia. Un promedio de ~4.400 RU de pAb anti-humano de cabra se inmovilizaron en cada carril.

Etapa 2: para cada ciclo, tres diferentes lotes de proteína de fusión de PVRIG humana (fc humano, GenScript lotes 451, 448, 125), proteína de fusión de DNAM-1 humano (fc humano, R&D Systems), proteína de fusión de TIGIT humano (fc humano, R&D Systems), y una IgG control humana (Synagis) se capturaron cada una sobre un carril vertical diferente durante dos minutos a una concentración de 2 µg/mL. PVR, dos lotes de PVRL2, y PVRL3 se inyectaron cada uno en la dirección del flujo horizontal a seis concentraciones diferentes sobre los seis ligandos capturados a diferentes ciclos de captura de ligando. Las inyecciones fueron de dos minutos seguido de 10 minutos de disociación a una tasa de flujo de 50µL/min. El rango de concentración de PVR fue 1,4nM-332nM en una serie de dilución de 3 veces, ambos lotes de PVRL2 se inyectaron a un rango de concentración de 1,3nM-322nM en una serie de dilución de 3 veces, y PVRL3 se inyectó a un rango de concentración de 1,4nM-334nM en una serie de dilución de 3 veces. Todos los reactivos de proteínas se prepararon en tampón de operación que fue tampón PBS desgasificado con la adición de Tween 20 al 0,05 % y BSA al 0,01%. Las superficies de captura de anti-fc humano se regeneraron con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 146 mM después de cada ciclo.

Etapa 3: los datos del sensorgrama de la unión de los analitos a cada ligando capturado se procesaron y referenciaron dos veces usando ProteOn Manager versión 3.1.0.6 usando la referencia de puntos intermedios y una inyección de preblanco idéntica a las inyecciones de analitos.

Resultados

a) PVR: se une débilmente a DNAM-1 y TIGIT capturados y no muestra unión a los tres lotes de PVRIG y a la IgG control. No se generó suficiente información como para estimar la KD de las interacciones de PVR con DNAM-1 y TIGIT (datos no mostrados).

b) PVRL2: ambos lotes de PVRL2 mostraron unión a los tres lotes de PVRIG y a DNAM-1, pero una unión mínima o ausente a TIGIT y ausencia de unión a la IgG control. Los sensorgramas mostraron cinéticas complejas, por lo tanto, no pudieron estimarse las constantes de unión (datos no mostrados).

c) PVRL3: mostró una unión mínima a TIGIT y no se unió a las otras proteínas (datos no mostrados).

B. Ejemplo 2: efecto de la inactivación de PVRIG (KD) y anticuerpo anti-PVRIG en la función de TIL específicos de melanoma humano

El objetivo de estos ensayos es evaluar la capacidad funcional de PVRIG en TIL derivados de humano, según se mide por marcadores de activación y secreción de citoquinas, después de cocultivo con células de melanoma diana.

1. Ejemplo 2(1):

Se evaluó el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CP A.7.021), que se ha mostrado que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2, solo o en combinación con otros anticuerpos (p. ej., anti-TIGIT, anti-DNAM1). PD1 se usó como un punto de control inmune de referencia para los estudios de inactivación (ARNsi).

Materiales y Métodos: TIL: se usaron linfocitos Infiltrantes en tumores (TIL) de tres pacientes con melanoma (1) TIL-412-HLA-A2 específico de Mart1, (2) TIL-F4-HLA-A2 específico de gp100, y (3) TIL-209- HLA-A2 específico de gp100. Los TIL se descongelaron en medio completo IMDM (BI, 01-058-1A) suplementado con suero humano al 10 % (Sigma, H3667) + Glutamax al 1 % (Life technologies, 35050-038) + Piruvato-Na al 1 % (Biological Industries, 03-042-1B) + aminoácidos no esenciales al 1 % (Biological Industries, 01-340-1B) + Pen-Estrep al 1 % (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 U/ml de rhIL2 (Biolegend, 509129).

Líneas celulares tumorales: las células de melanoma humano Mel-624 expresan los antígenos MART-1 y gp-100 en el contexto del halotipo de MHC-I HLA-A2. Las células se cultivaron en medio completo DMEM suplementado con 10 %, tampón HEPES 25 mM, 1 %, y Pen-Estrep al 1 %.

Inactivación en los TIL: la inactivación (KD) de PVRIG humano y PD1 humano en los TIL se hizo usando 100 pmoles de ARNsi de PVRIG humano Dharmacon ON-TARGETplus-SMARTpool (L-032703-02) o ARNsi de PD1 humano-SMARTpool (L-004435) o ARNsi no dirigido (D-001810-01-05). Los ARNsi se electroporaron en los TIL (AMAXA, programa X-005). La electroporación se hizo en TIL en reposo cultivados en IMDM completo suplementado con IL-2 24hr después de la descongelación. Después de la electroporación, los TIL se sembraron en una placa TC de 96 pocillos para recuperación durante 24hr. Después de 24 hr, las células se recogieron y se tiñeron con agente de tinción de viabilidad (BD Horizon; No. de Cat. 562247, BD biosciences), se lavaron con PBS y se tiñeron con anti-PVRIG humano-CPA.7.021 (CPA.7.021 IgG2 A647, 7,5ug/ml) o con anti-PD-1 humano (Biolegend, #329910 AF647, 5ug/ml) a temperatura ambiente durante 30min. El control de isotipo usado es synagis (IgG2 A647, 7,5ug/ml) e IgG1 de ratón (Biolegend #400130 A647, 5ug/ml), respectivamente. Todas las muestras se operaron en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron usando software FlowJo (v10.0.8).

Cocultivo de los TIL con células de melanoma 624: los TIL electroporados con ARNsi se recogieron y se sembraron en una placa TC de 96 pocillos a 5x104/pocillo. Las células Mel-624 también se recogieron y se sembraron en relaciones 1:1/1:3 E:T en cocultivo. La placa se incubó toda la noche (18hr) a 37 °C, CO2 al 5 %.

Para evaluar el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), anti-TIGIT (Clon 10A7; de Genentech Solicitud de Patente de EE. UU. No. US 2009/0258013) y anti-DNAM1 (clon DX11, descrito en primer lugar en Shibuya et al Immunity Volumen 4, Número 6, 1 de junio de 1996, Páginas 573-581; BD Biosciences; Clon DX11 de anti-DNAM-1 humano de ratón, No. de Cat. 559787) en la actividad de TIL específicos de melanoma, los TIL (1x105 células/pocillo) se preincubaron con anticuerpos ensayados o controles de isotipo relevantes en monotratamiento (10µg/mL) o en tratamiento de combinación (final 10µg/mL para cada uno) antes de la adición de células diana de melanoma 624 a una relación 1:1 Efector:Diana. La placa se incubó toda la noche (18hr) a 37 °C, CO2 al 5 %.

Evaluación de la activación de los TIL: 16 horas después del cocultivo, las células se tiñeron con agente de tinción de viabilidad (BD Horizon; No. de Cat. 562247, BD biosciences), se lavaron con PBS y se expusieron a disolución de bloqueo de Fc (no. de cat. 309804, Biolegend), seguido de tinción en superficie con anti-CD8a (No. de Cat. 301048, Biolegend) y anti-CD137 (No. de Cat. 309804, Biolegend) a 4 °C durante 30min. Todas las muestras se operaron en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron usando software Flow Jo (v10.0.8). Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se analizaron para determinar la secreción de citoquinas por el kit CBA (No. de Cat. 560484, BD).

Resultados

Inactivación de PVRIG en los TIL: se cultivaron TIL MART-1 y TIL F4 24 hr con IL-2. Se electroporaron 100 pmoles de ARNsi de PVRIG humano ON-TARGETplus-SMART pool (L-032703-02) o ARNsi de PD1 humano-SMARTpool (L-004435) o ARNsi no dirigido (D-001810-01-05) en los TIL (AMAXA, programa X-005). La detección de PVRIG o PD-1 se realizó 24 hr después de la electroporación (y antes del cocultivo). Las células se tiñeron con el agente de tinción de viabilidad seguido de una incubación de 30min a RT con anti-PVRIG o anti PD-1. El porcentaje de población KD se indica en la Figura 82 de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria.

Ensayo funcional usando TIL inactivados: los TIL humanos, cultivados durante 24 horas con IL2 se electroporaron con ARNsi que codifica PVRIG o PD-1 humano o una secuencia aleatoria como control. Los TIL se ensayaron para determinar la expresión de PVRIG y PD-1 24 hr después de la electroporación. Se observó un ~80 % de inactivación de PVRIG y un ~50 % de inactivación de PD-1 en comparación con los TIL electroporados con secuencias aleatorias, como se demuestra en la Figura 82 de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria.

Los TIL KD se cultivaron con células Mel-624 en 1:1 o 1:3 E:T durante 18hr y se tiñeron para determinar la expresión de CD137. Se mostraron niveles elevados del marcador de activación CD137 en TIL MART-1 electroporados con ARNsi de PVRIG, de forma similar a los TIL que se electroporaron con ARNsi de PD-1, en comparación con el ARNsi de secuencia aleatoria control (como se demuestra en la Figura 83A de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria). Se recogió el sobrenadante de los cultivos y se ensayó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. Los TIL que se electroporaron con ARNsi de PVRIG muestran un incremento significativo en los niveles de IFNγ y TNF en comparación con el ARNsi control SCR. Se mostró un efecto similar en los TIL que se electroporaron con ARNsi de PD-1 (como se demuestra en la Figura 83B-C de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria).

Se observó la misma tendencia de incremento en los niveles de activación en TIL F4. El cocultivo de TIL F4 electroporados con ARNsi de PVRIG con Mel-624 en 1:3 E:T dio lugar a niveles incrementados de la expresión en superficie de CD137, así como a una secreción incrementada de IFNγ en el sobrenadante de los cultivos como se muestra en la Figura 84A y 84B de USSN 15/048.967, incorporado por referencia en la presente memoria. Se observaron tendencias similares en los TIL que se electroporaron con ARNsi de PD-1.

Ensayo funcional usando Ab bloqueantes:

Monoterapia y terapia de combinación in vitro con anti-PVRIG y anti-TIGIT: se cultivaron TIL 209 con células Mel-624 en 1:1 E:T durante 18hr. Se recogió el sobrenadante de los cultivos y se ensayó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento con anti-TIGIT no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF. Sin embargo, se observó un incremento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadieron anti-TIGIT y anti-PVRIG al cocultivo en combinación (Figura 8A-B).

Monoterapia y terapia de combinación in vitro con anti-PVRIG y anti-TIGIT: se cultivaron TIL 209 con células Mel-624 en 1:1 E:T durante 18hr. Los TIL se tiñeron para la expresión en la superficie del marcador de activación CD 137 y mostraron un nivel reducido de expresión después del tratamiento con anti-DNAM-1. Se recogió el sobrenadante de los cocultivos y se ensayó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento de anti-DNAM-1 medió una tendencia de incremento de citoquinas secretadas IFNγ y TNF. El tratamiento con anti-DNAM-1 y anti-PVRIG en combinación revertió parcialmente el efecto sobre la expresión de CD137 (Figura 9C) y aumentó el efecto sobre la secreción de citoquinas IFNγ y TNF (Figura 9A-B). Se cultivaron TIL MART-1 con células Mel-624 en 1:1 E:T durante 18hr. Se recogió el sobrenadante de los cocultivos y se ensayó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento con anti-DNAM-1 redujo la expresión en superficie de CD137 en los TIL y también las citoquinas secretadas IFNγ y TNF. El tratamiento con anti-DNAM-1 y anti-PVRIG en combinación revertió parcialmente estos efectos (Figura 9D-F).

Resumen y conclusiones: PD1 KD mejoró la actividad de TIL según se mide por la secreción de IFNγ en TIL F4 y MART-1. Se observó un incremento (~20%) de la secreción de IFNγ y TNF sobre PVRIG KD en TIL MART-1 en comparación con el ARNsi control. La misma tendencia se observó en la expresión de CD137 después del cocultivo con células de melanoma 624 en TIL F4.

El tratamiento de anti-TIGIT no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF de los TIL cocultivados con Mel 624, sin embargo, se observó un incremento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadieron anti-TIGIT y anti-PVRIG (CPA.7.021) al cocultivo en combinación.

El tratamiento con anti-DNAM-1 redujo la activación de TIL-MART-1 manifestada por CD137 y secreción de citoquinas reducidos y anti-PVRIG (CPA.7.021) pudo revertir parcialmente este efecto en el tratamiento en combinación con Ab frente a DNAM-1. En TIL 209, los niveles de secreción de IFNγ y TNF estaban ligeramente elevados (~10%) con anti-DNAM-1, y se observó un incremento en los niveles de IFNγ y TNF (~40% y 30%, respectivamente) cuando se añadieron anti-DNAM1 y anti-PVRIG (CPA.7.021) al cocultivo en combinación. Colectivamente, nuestros resultados mostraron que PVRIG es un nuevo receptor coinhibidor para PVRL2.

2. Ejemplo 2(2):

Se evaluó el efecto de anticuerpos adicionales anti-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538), que se ha mostrado que bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2, solos o en combinación con otros anticuerpos (p. ej., anti-TIGIT, PD1) en la actividad de TIL-209, TIL-412 y TIL-463-F4 después del cocultivo con la línea celular de melanoma 624.

Los anticuerpos funcionales usados en este ensayo fueron Ab de hibridoma anti-hPVRIG (núcleo mIgG1)-CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538 (Ml no de lote #30816); anti-hTIGIT (núcleo mIgG1)-clon 10A7 (Genescript), clon anti-TIGIT MBSA43 (e-biosciences) y mIgG1 (no. de cat. 400166, clon MOPC-21, Biolegend).

Cocultivo de TIL y mel 624: los TIL se descongelaron y se cultivaron como se describe en 2.1 24 hr antes del cocultivo. Los Ab ensayados se añadieron en monotratamiento (10ug/mL) o en combinación con anti-TIGIT (20ug/mL) a TIL sembrados y se incubó (en total 100uL) durante 1hr a 37 °C, CO2 al 5 %. Las células Mel-624 se recogieron y se sembraron en una relación 1:3 Efector:Diana en cocultivo con los TIL. La placa se incubó toda la noche (18hr) a 37 °C, CO2 al 5 %.

Evaluación de la capacidad funcional de los TIL: la actividad de las células T se evaluó sobre la base de la detección de IFNγ en los sobrenadantes de los cocultivos. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se ensayaron para determinar las citoquinas por un kit de CBA (No. de Cat. 560484, BD) o por un kit MAGPIX de IFNγ/TNFα humano. Se calcularon ensayos de la T no emparejados de dos colas. P<0,05 se refirió como estadísticamente significativo.

Resultados

Ensayo funcional usando TIL y células de melanoma en presencia de Ab de hibridoma anti-PVRIG: los TIL humanos, cultivados durante 24 horas con IL2, se cocultivaron con células Mel-624 en 1:3 E:T durante 18hr y se ensayaron para determinar la secreción de citoquinas. La Figura 31 describe un experimento representativo de 5-6 realizados. Se cocultivaron los TIL con células de melanoma 624 en presencia de Ab anti-TIGIT o anti-PVRIG (azul) o en combinación de anti-TIGIT y anti-PVRIG (verde) y se ensayaron para determinar la secreción de IFNγ/TNF. En este experimento, los 4 monotratamientos con Ab anti-PVRIG incrementaron (20-30 %) la secreción de IFNγ en 2 de 3 TIL ensayados (TIL-209 y TIL463-F4), mientras en combinación con anti-TIGIT, todos los Ab anti-PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.530, CHA.7.538 incrementaron la secreción de IFNγ en comparación con el tratamiento con anti-TIGIT solo.

Se encontró que el efecto del Ab CHA.7.518.1.H4(S241P) era estadísticamente significativo a lo largo de los experimentos en TIL 463-F4-gp100 en 5 experimentos como monotratamiento y en combinación con anti-TIGIT (Figura 9E, G). El efecto del tratamiento en combinación del Ab anti-PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P) también fue estadísticamente significativo en TIL 209 (Figura 9C). Se encontró que el efecto del tratamiento en combinación del Ab anti-PVRIG CHA.7.538 era estadísticamente significativo en TIL 463-F4-gp100 (Figura 9F).

Resumen y conclusiones: en los sistemas experimentales descritos en la presente memoria observamos un efecto de anti-PVRIG en los TIL en respuesta a células de melanoma diana como se observa por los cambios en la secreción de IFNγ. Los Ab de hibridoma anti-PVRIG ensayados mediaron un incremento en la secreción de IFNγ en comparación con el control de isotipo relevante. El Ab CHA.7.518.1.H4(S241P) parece tener una ventaja en la mediación de un incremento en la secreción de IFNγ como un monotratamiento y en comparación con otros Ab aPVRIG ensayados, sin embargo, la magnitud de estos efectos varía entre diferentes TIL. Este efecto se aumenta en combinación con el tratamiento con anti-TIGIT.

3. Ejemplo 2(3):

El objetivo es evaluar la actividad funcional de anticuerpos anti-PVRIG humano (CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.544; o CHA.7.538) en la actividad de los TIL humanos después del cocultivo con células CHO-S pulsadas con el péptido que coexpresan de forma estable HLA-A2, microglobulina b2 (B2M) y PVRL2.

Se usaron TIL de metástasis reseccionadas de tres pacientes con melanoma: TIL-412-HLA-A2 específico de Mart1 (26-35), TIL-463-F4-HLA-A2 específico de gp100 (209-217), TIL-463-F5-HLA-A2 específico de gp100 (209-217), y TIL-209-HLA-A2 específico de gp100 (209-217).

Los TIL se descongelaron en medio completo IMDM suplementado con suero humano al 10 % + Glutamax al 1% + Piruvato-Na al 1 % + aminoácidos no esenciales al 1 % + Pen-Estrep al 1 % + 300 U/ml de rhIL2 (Biolegend, 589106).

Las células CHO-S (células diana) se transdujeron de forma estable con un lentivirus que expresa HLA-A2/B2M (vector de lentivirus no. de cat. CD515B-1-SBI, system biosciences) y se crecieron bajo selección con 600ug/ml de higromicina B en medio CD CHO (No. de Cat. 10743-011) suplementado con GlutaMax 8mM 1 % y Pen/Estrep al 1 %. Las células que expresaban HLA-A2/B2M se clonaron entonces por dilución limitante. El clon 3E8 con alta expresión de HLA-A2 y B2M se transdujo entonces con un lentivirus que expresaba PVRL2 humano (vector lentivirus no. de cat. CD510B-1-SBI, system biosciences), y se crecieron bajo selección con 6ug/ml de puromicina.

En el sistema experimental descrito en la presente memoria (representado en la Figura 35), se cocultivaron TIL reactivos para gp100 o MART-1 que expresan de forma endógena TIGIT, DNAM-1 y PVRIG Figura 37) con células CHO-S HLA-A2/B2M/PVRL2 pulsadas con el péptido.

Los anticuerpos funcionales usados en este ensayo fueron anti-PVRIG humano; Ab 461 (Aldeveron)-referido a 544 en este ejemplo, Ab quimera anti-PVRIG humano (núcleo hIgG4)-CHA.7.538; CHA.7.518 (referido a c538 y c518 en este ejemplo, que significa que las regiones pesada y ligera variables de 7.538 y 7.518 se fusionaron con regiones constantes de IgG4 humana anti-TIGIT humano (núcleo mIgG1) clon MBSA43 (e-biosciences), mIgG1 (biolegend) y hIgG4 (biolegend).

Los TIL se descongelaron y se cultivaron como se describe en la presente memoria durante 24hr antes del cocultivo con las células diana. Los anticuerpos ensayados se añadieron en monotratamiento (10ug/mL) o en combinación con anti-TIGIT (total 20ug/mL) a TIL sembrados y se incubó (en total 100uL) durante 30min a 37 °C, CO2 al 5 %. Las células CHO-S se recogieron y se pulsaron con 0,1 o 0,5ug/ml de gp-100 (gp100209-217) o con 20ug/ml de péptidos MART-126-35, durante 1 hora a 37 °C en medio Opti-MEM™ con suero reducido. Después de tres lavados con medio Opti-MEM™ con suero reducido, las células diana pulsadas con los péptidos se cocultivaron toda la noche (18hr) con TIL a una relación Efector:Diana de 1:3 (33k:100k).

Evaluación de la capacidad funcional de los TIL: el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG (10ug/ml) como monotratamiento o como tratamiento de combinación con anti-TIGIT en la actividad de los TIL se evaluó usando la medición de la secreción de citoquinas de sobrenadantes de cocultivos de toda la noche usando el kit de Combined Bead Array (CBA) (No. de Cat. 560484, BD). Todas las muestras se adquirieron en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron usando software Flow Jo (v10.0.8).

Respuesta a la dosis de anticuerpos anti-PVRIG: el efecto de la respuesta a la dosis de los anticuerpos anti-PVRIG c518, c538 (o control de isotipo hIgG4) se ensayó en el ensayo descrito con una concentración de anticuerpos de 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03ug/ml. Se calcularon ensayos de la T no emparejados de dos colas. P<0,05 se refirió como estadísticamente significativo.

Resultados

Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en la actividad de los TIL después del cocultivo con células CHO-S HLA-A2/B2M que expresan PVRL2: el efecto de tres anticuerpos anti-PVRIG (544, c538 y c518) en la actividad de cuatro diferentes TIL (412, 463, 462 y 209) de dos experimentos diferentes se resume en la Figura 37. Ab sirvió como Ab control no bloqueante. Los resultados detallados de los experimentos se presentan en la Figura 39. El tratamiento con los anticuerpos 544, c538 y c518 incrementó los niveles de la secreción de IFN de los TIL (de promedio un 6 %, 28 % y 23 %, respectivamente) en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de isotipo. La secreción incrementada de IFN se detectó en los TIL tratados con c538 o c518 en comparación con 544, el control no bloqueante. No se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos con los Ab c538 a c518. El tratamiento con anti-TIGIT incrementó la secreción de IFN de los TIL (de promedio un 49 %) en comparación con el isotipo. El tratamiento de combinación de c518 y c538 con anti-TIGIT indujo un efecto aditivo en la secreción de IFN de los TIL, pero el efecto de la combinación no fue estadísticamente significativo en comparación con el tratamiento con monotratamiento de TIGIT.

Efecto de la respuesta a la dosis de los anticuerpos anti-PVRIG en la capacidad funcional de los TIL: se evaluó el efecto de la adición de anticuerpos anti-PVRIG (c538 y c518) en la respuesta a la dosis en la actividad de los TIL F4 y 209 (figura 80). La CE50 de los anticuerpos c518 y c538 está en un único dígito nM en comparación con el control de isotipo según se mide por el efecto de la secreción de TNFα de los TIL.

Resumen y conclusiones: en el sistema experimental descrito en la presente memoria observamos un efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en la actividad de los TIL en respuesta al cocultivo con células diana CHO-S HLA-A2/B2M pulsadas con los péptidos que sobreexpresan PVRL2. Los anticuerpos anti-PVRIG que se ensayaron mediaron una secreción incrementada de IFN y TNF de los TIL en comparación con el control de isotipo relevante. Los anticuerpos c518 y c538 tienen una ventaja estadística significativa (p-0,0063 y p-0,0034, respectivamente) en la actividad de los TIL, según se manifiesta por la secreción de IFN, en comparación con 544, que es un anticuerpo no bloqueante de PVRIG (sobre la base del experimento de competición realizado en células que expresan PVRIG). Tanto los anticuerpos c518 como c538 tuvieron un efecto aditivo con el anticuerpo anti-TIGIT (no estadísticamente significativo).

4. Ejemplo 2(4)

El objetivo de este ejemplo fue evaluar la capacidad funcional de PVRIG en los TIL derivados de humanos, según se mide por la secreción de citoquinas después del cocultivo con células de melanoma diana. Se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538), que se ha mostrado que bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2, solos o en combinación con otros anticuerpos (p. ej., anti-TIGIT, PD1).

Se obtuvieron células T CD3+ purificadas usando el kit de mezcla de enriquecimiento de células T humanas Rossetesep (Stem cell technologies) en muestras de capa leucocitaria sanguínea. Las células se descongelaron y se marcaron con CFSE (Moleculare probes) para poder seguir la proliferación en el cocultivo.

Células CHO-S-OKT3: las células CHO-S se transdujeron con CD5L-OKT3-scFv-CD14 en CD710B-1 (SBI, no. de cat. CS965A-1, no. de lote 151014-005, 1,40x108 ifus/ml). Las células se cultivaron en presencia de CD CHO (Gibco, life technologies No. de Cat. 10743 -011) con la adición de GlutaMax 8mM y 6µg/ml de puromicina. Se evaluaron los

niveles en superficie de OKT3 por citometría de flujo usando PE-anti-F(ab)'2 de IgG de ratón de cabra a una dilución 1:200 (Jackson Immunoresearch, no. de cat. 115-116-146). Las células CHO-S-OKT3 se transfectaron de forma transitoria con PVRL2 humano (isoforma delta) o vector vacío usando el sistema de electroporación Amaxa (Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se usaron 5ug de plásmido pcDNA3.1 (vector vacío o hPVRL2) por 2X106 células en Disolución de Electroporación Ingenio™ (Mirus, No. de Cat. MC-MIR-50115) y el programa de pulsos U-024. La expresión de PVRL2 en células CHOS-S-OKT3 transfectadas se evaluó por citometría de flujo usando Ab anti-PVRL2 (no. de cat. 337412, Biolegend).

Los anticuerpos funcionales usados en este ensayo fueron Ab de hibridoma anti-hPVRIG (núcleo mIgG1)-CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538, clon anti-TIGIT MBSA43 (e-biosciences) y mIgG1 (no. de cat. 400166, clon MOPC-21, Biolegend).

Cocultivo de células T CD3 y células CHO-OKT3: se descongelaron células T CD3+ y se marcaron inmediatamente con CFSE. En paralelo, se recogieron células CHO-S-OKT3-PVRL2 y se trataron con Mitomicina-C durante 1 hr a 37 °C, se lavaron y se añadieron al cocultivo con T células en 1:5 E:T (1x105 células T y 2x104 CHO-OKT3-PVRL2 o simulado). Los Ab se añadieron en monotratamiento (10ug/mL) o en combinación con anti-TIGIT (10ug/mL) y las placas del cocultivo se incubaron a 37 °C, CO2 al 5 % durante 5 días. Después de 5 días, las células se recogieron y se analizó la proliferación de las células T por FACS seleccionando las subpoblaciones CD4 y CD8.

Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en el ensayo de cocultivo con CHOS-OKT3: se estimularon células T marcadas con CFSE con células estimuladoras (células CHO que expresan fragmentos de mAb anti-CD3 unidos a membrana). Las células estimuladoras CHOS que expresan PVRL2 humano y las células estimuladoras control (vector vacío) se trataron con mitomicina C (50ug/ml durante 1h) antes del cocultivo con células T humanas marcadas con CFSE a la relación de 1:5. Después de 5 días a 37 °C y CO2 al 5,0 %, se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG (10ug/ml) en la proliferación de las células T (dilución de CFSE) y en la secreción de citoquinas (ELISA o kits CBA TH1/2/17) en los sobrenadantes de los cultivos. Todas las muestras se adquirieron en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron usando software FlowJo (v10.0.8). Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se analizaron para determinar la secreción de citoquinas por el kit CBA (No. de Cat. 560484, BD).

Resultados

Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en la sobreexpresión de PVRL2 en el ensayo de CHOS-OKT3: se cocultivaron células CHOS-OKT3 que sobreexpresan PVRL2 o simulado (vector vacío) con células CD3+ y se ensayó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG como monotratamiento o en combinación con anti-TIGIT en la proliferación de las células T y en la secreción de citoquinas (figura 40). Después de 5 días, las células se recogieron y se analizaron por dilución de CFSE. En paralelo, se recogió el sobrenadante de los cocultivos y se ensayó para determinar la secreción de citoquinas. La Figura 41 muestra el efecto de los Ab anti-PVRIG en donante respondedor frente a no respondedor. Se evaluó el efecto de varios Ab anti-PVRIG en la proliferación de las células T como mono tratamiento en combinación con anti-TIGIT. Aunque algunos Ab anti-PVRIG aumentan la proliferación de las células T, no se observó un efecto aditivo con anticuerpo anti-TIGIT en este sistema (Figura 42). Estos efectos no se observaron cuando los Ab se ensayaron en cocultivo de células CD3+ con células CHO-S con simulación (transfectadas con vector vacío) (datos no mostrados).

Se ensayó un total de 10 donantes y 5 de 10 donantes respondieron a los Ab anti-PVRIG. El tratamiento de Ab CHA.7.518.1.H4(S241P) dio lugar de forma consistente a una secreción aumentada de IFNγ que varió entre el 20-50 % en los 5 donantes respondedores ensayados, mientras el tratamiento con otros Ab no demostró una tendencia clara (Figura 43). Se observaron efectos similares en la proliferación de las células CD8+. El efecto del tratamiento con los Ab se resume en la Figura 44.

C. Ejemplo 3: efecto de anticuerpo anti-PVRIG en la función de TIL específicos de melanoma humano en combinación con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD1

1. Ejemplo 3(1):

Materiales y Métodos

TIL: se usaron linfocitos infiltrantes en tumores (TIL) de tres pacientes con melanoma: (1) TIL-412-HLA-A2 específico de Mart1, (2) TIL-F4-HLA-A2 específico de gp100 y (3) TIL-209-HLA-A2 especifico de gp100.

Los TIL se descongelaron en medio completo IMDM (BI, 01-058-1A) suplementado con suero humano al 10 % (Sigma, H3667) + Glutamax al 1 % (Life technologies, 35050-038) + Piruvato-Na al 1 % (Biological Industries, 03-042-1B) + aminoácidos no esenciales al 1 % (Biological Industries, 01-340-1B) + Pen-Estrep al 1 % (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 U/ml de rhIL2 (Biolegend, 509129).

Líneas celulares tumorales: las células de melanoma humano Mel-624 expresan los antígenos MART-1 y gp-100 en el contexto del halotipo de MHC-I HLA-A2. Las células se cultivaron en medio completo DMEM (Biological Industries, 01-055-1A) suplementado con FBS al 10 % (BI, 04-127-1A), tampón HEPES 25 mM (BI, 03-025-lB), Glutamax al 1 % (Life technologies, 35050-038), y Pen-Estrep al 1 % (Biological Industries, 03-031-1B).

Cocultivo de TIL con células de melanoma 624 en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-PVRIG, anti-TIGIT y frente a PD1: para evaluar el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), anti-TIGIT (Clon 10A7) y anti-PD1 (mAb 1B8, Merck) en la actividad de los TIL específicos de melanoma, los TIL (3x104células/pocillo) se preincubaron con los anticuerpos ensayados o controles de isotipo relevantes en monotratamiento (10µg/mL) o en tratamiento de combinación (final 10µg/mL para cada uno) antes de la adición de células de melanoma diana 624 a una relación 1:3 Efector:diana. La placa se incubó toda la noche (18hr) a 37 °C, CO2 al 5 %.

Evaluación de la activación de los TIL: los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se analizaron para determinar la secreción de citoquinas por el kit CBA (No. de Cat. 560484, BD).

Monoterapia en vitro anti-PVRIG y terapia combinada con anticuerpos bloqueantes anti-TIGIT y PD1: se cultivaron TIL F4 (específicos de gp100) con células Mel-624 en 1:3 E:T durante 18hr. El sobrenadante de los cocultivos se recogió y se ensayó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento de anti-TIGIT o anti-PD1 no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF. Sin embargo, se observó un incremento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadieron anti-TIGIT o anti-PD1 en combinación con anti-PVRIG al cocultivo en combinación (Figura 10A-B).

El tratamiento de anti-PVRIG, anti-TIGIT y PD1 solos no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF del cocultivo de los TIL con Mels 624, sin embargo, se observó un incremento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadieron los anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD1 en combinación con anti-PVRIG (CP A.7.021). Los datos presentados sugieren que hay un efecto sinérgico para la terapia de combinación con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD1.

2. Ejemplo 3(2):

De nuevo, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-PVRIG para aumentar la función de las células T CD4+ y CD8+ en combinación con un anticuerpo anti-TIGIT en un ensayo basado en células primario in vitro.

Ensayo de CHO-S OKT3: el ensayo de CHO-S OKT3 se utilizó para determinar si la combinación de un anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y un anticuerpo anti-TIGIT disponible comercialmente podría incrementar la proliferación de las células T, y la secreción de citoquinas más que un tratamiento con un único anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT. Las células diana usadas en el ensayo de cocultivo fueron la línea celular de ovario de hámster chino, CHO-S (ATCC), que sobreexpresa de forma estable el fragmento variable de cadena única del anticuerpo anti-CD3 humano Clon OKT3 (abreviado como OKT3), y PVRL2 humano (abreviado como hPVRL2). Las células parentales CHO-S OKT3 se crecieron en medio CD-CHO sin suero suplementado con glutamax 40mM, penicilina/estreptomicina, y 6µg/ml de puromicina. Las células CHO-S OKT3 hPVRL2 se crecieron en medio CD-CHO sin suero suplementado con glutamax 40mM, penicilina/estreptomicina, 6µg/ml de puromicina, y 600 µg/ml de higromicina B.

Se aislaron células T CD3+ y CD8+ primarias de donantes humanos sanos usando la mezcla de enriquecimiento de células T CD3+ humanas RosetteSep™ (Stemcell Technologies), y los microlechos de CD8+ humano (Miltenyi Biotec), respectivamente, y se congelaron en nitrógeno líquido. En el día del ensayo del cocultivo, Las células T CD3+ o CD8+ se descongelaron, se contaron, y se marcaron con CFSE 1µM (Life Technologies) durante 10 minutos a 37 °C. Después de esta incubación, las células T se lavaron y se resuspendieron en medio completo que contenía RPMI, suplementado con FBS inactivado con calor al 10 %, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, y β-mercaptoetanol 50µM. Las células CHO-S OKT3 hPVRL2 se recogieron del cultivo, y se trataron con mitomicina C durante 1 hora a 37 °C con mezclado periódico. Después de la incubación, las células diana se lavaron concienzudamente, se contaron, y se resuspendieron en medio completo RPMI. El ensayo se estableció con una relación 5:1 de células T (100.000) a células diana (20.000). Las células diana, células T, y 10µg/ml de cada tratamiento con anticuerpo se añadieron conjuntamente a una placa de fondo en U de 96 pocillos (Costar), y se incubó bien durante 3 días (células T CD8+), o 5 días (células T CD4+) a 37 °C. Los tratamientos con anticuerpo incluyeron IgG4 CHA.7.518.1.H4(S241P) humano solo, un control de isotipo de IgG4 humana combinado con el anti-TIGIT humano de ratón (Clon MBSA43, eBioscience), y una combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y anti-TIGIT (Clon MBSA43). Además, también se evaluó la actividad de la IgG1 anti-DNAM-1 humano de ratón (Clon DX11, BioLegend), control de isotipo de IgG1 de ratón (Clon MOPC21, BioLegend), y un control de isotipo de IgG4 humana.

Después del periodo de incubación de 3 o 5 días, los sobrenadantes de los cocultivos se analizaron para determinar citoquinas secretadas, incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNFα, e IFNγ, con el kit de citoquinas Th1/Th2/Th17 humanas de matriz de lechos citométricos (CBA) (BD Biosciences), o con el kit de citoquinas Th humano LEGENDplex™ (BioLegend). La proliferación de las células T se midió por tinción de las células T CD4+ o CD8+ el kit de tinción de células LIVE/DEAD fixable aqua (ThermoFisher Scientific), anticuerpo anti-CD4 (Clon RPA-T4, BioLegend), y anticuerpo anti-CD8 (Clon HIT8a, BioLegend), y seleccionando el porcentaje de células T CD4+ o CD8+ vivas proliferantes, con CFSE bajo. Los datos se adquirieron usando un FACS Canto II (BD Biosciences), y se analizaron usando software Flow Jo (Treestar) y Prism (Graphpad).

Resultados: la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y un anticuerpo anti-TIGIT aumenta la proliferación de las células T CD4+ en comparación con los tratamientos con un único anticuerpo: La capacidad del anticuerpo frente a PVRIG derivado de hibridoma humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), de aumentar la proliferación de las células T CD4+ primarias in vitro cuando se combina con un anticuerpo anti-TIGIT se evaluó con el ensayo CHO-S OKT3.

Las Figuras 33A y B muestran el porcentaje de células T CD4+ proliferantes de dos donantes diferentes en respuesta al cocultivo con las células diana CHO-S OKT3 hPVRL2, y tratadas con anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT bien solos o en combinación. En estos dos donantes humanos representativos de células T CD3+, la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT incrementa la proliferación de las células T CD4+ en comparación con CHA.7.518.1.H4(S241P) solo, o la combinación del isotipo IgG4 y el anticuerpo anti-TIGIT. El anticuerpo anti-DNAM-1 reduce la proliferación de las células T CD4+ en comparación con el control de isotipo IgG1 en ambos donantes.

CHA.7.518.1.H4(S241P) y un anticuerpo anti-TIGIT aumenta la proliferación de las células T CD8+ y la secreción de IFN-g. La Figura 34A ilustra la capacidad del anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), de incrementar la proliferación de las células T CD8+ en combinación con el anticuerpo anti-TIGIT en el ensayo CHO-S OKT3. En un donante humano representativo de células T CD8+, la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT incrementa la proliferación de las células T CD8+ cuando las células T se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La combinación de anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT incrementa la proliferación más que CHA.7.518.1.H4(S241P) solo, o el isotipo hIgG4 más el tratamiento con el anticuerpo anti-TIGIT. La Figura 34B muestra que en el mismo donante humano representativo de células T CD8+ que el descrito anteriormente, el anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), en combinación con el anticuerpo anti-TIGIT también aumenta la secreción de IFNγ en el ensayo CHO-S OKT3. La combinación de anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT incrementa la secreción de IFNγ más que CHA.7.518.1.H4(S241P) solo, o el isotipo hIgG4 más el tratamiento con el anticuerpo anti-TIGIT. El anticuerpo anti-DNAM-1 reduce tanto la proliferación de las células T CD8+ como la producción de IFNγ en comparación con el anticuerpo de control de isotipo IgG1.

Resumen y conclusiones

Conjuntamente, el anticuerpo frente a PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT tuvieron actividad funcional in vitro en el ensayo basado en células CHO-S OKT3 primarias. La combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT dio lugar a una proliferación incrementada de las células T CD4+ y CD8+, así como secreción de IFNγ de células T CD8+ en comparación con el tratamiento con cualquiera de CHA.7.518.1.H4(S241P) o el anticuerpo anti-TIGIT solos. Conjuntamente, estos datos demuestran que el cobloqueo de los dos receptores de puntos de control, PVRIG y TIGIT, incrementó la función de las células T en comparación con el bloqueo de un único receptor.

Debe indicarse que TIGIT no interacciona con CD112 (PVRL2; véanse las Figuras 4E y 4F de Zhu et. al., J. Exp. Med. (2016): 1-10); en lugar de esto, interacciona con PVR, un ligando diferente. PVR se expresa en el sistema CHO/CD112 de Zhu et al. Por consiguiente, nuestra interpretación del efecto de la combinación de aCD112R (anticuerpo anti-PVRIG) y anti-TIGIT es que aCD112R/aPVRIG está bloqueando la interacción de CD112R humano con CD112 humano, pero el anticuerpo anti-TIGIT está bloqueando la interacción de TIGIT humano con PVR humano o de hámster (en células T o células CHO), Zhu et al no proporcionan realmente una hipótesis de por qué está ocurriendo el efecto de la combinación anti-CD112R/anti-TIGIT en el ensayo CHO CD112. Esto es, el efecto de la combinación no es a través solo del ligando PVRL2/CD112.

D. Ejemplo 4: mapeo de epítopos de los anticuerpos anti-PVRIG humano sobre la base de la reactividad cruzada con cynomolgus

Base racional y objetivos

El objetivo de este estudio es identificar los epítopos en la proteína PVRIG que determinan la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-PVRIG humanos frente al ortólogo de mono cynomolgus (cyno). Muchos de los anticuerpos frente a la diana PVRIG humano muestran grados variados de reactividad cruzada con cyno a pesar del hecho de que muchos de estos anticuerpos pertenecen a la misma clase de epítopos. Para arrojar luz en la base molecular de la reactividad cruzada humano/cyno (o la ausencia de ella), se diseñaron varias mutaciones de cyno a humano de las proteínas PVRIG recombinantes, se expresaron y se purificaron, y se ensayaron para determinar la unión a un panel de anticuerpos anti-PVRIG humano en ELISA.

Métodos

Diseño de las variantes cyno a humano de PVRIG: el alineamiento de secuencias de ECD de humano y PVRIG muestra un 90 % de identidad de secuencia y un 93 % de homología de secuencia entre los ortólogos humano y de cyno. Sobre la base de la naturaleza de las mutaciones (conservadas frente a no conservadas) y la predicción de la estructura secundaria (espiral frente a extendida) de la región de las mutaciones, se diseñaron tres mutantes de sitio dirigido de PVRIG de cyno para ensayar la reactividad cruzada de cyno centrada en el mapeo de epítopos. Estos mutantes incluyen H61R, P67S, y L95R/T97I de PVRIG de cyno. También se generaron PVRIG de cyno y humano de tipo salvaje.

Expresión y purificación de variantes de PVRIG de cyno, humano, e híbridas: todas las variantes de PVRIG se expresaron como fusiones de ECD con una etiqueta 6XHis C-terminal en células de mamíferos. Las proteínas se purificaron por purificación de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de exclusión por tamaño. Se intercambió el tampón de las proteínas purificadas a tampón PBS (pH 7,4) y se almacenaron a 4 °C.

ELISA para determinar la interacción PVRIG-anticuerpo: el ELISA funcional se realizó como sigue: PVRIG de cyno, humano, y proteínas recombinantes híbridas cyno/humano (etiquetada con His) se adsorbieron en una placa IA toda la noche a 4 °C. Los pocillos recubiertos de la placa se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 300 µL de tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5 % en PBS pH 7,4) a temperatura ambiente (RT) durante 1 hr. El tampón de bloqueo se retiró y las placas se lavaron dos veces más con PBS. Las variantes de PVRIG unidas a la placa se incubaron con mAb anti-PVRIG humano (isotipo igG1 humano) en disolución (rango lineal de 0,1 µg/mL a 8 µg/mL en un volumen de 50 µL/pocillo) a RT durante 1 hr. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T (PBS 7,4, Tween20 al 0,05 %), después tres veces con PBS y se añadieron 50µL/pocillo de un anticuerpo secundario conjugado con HRP (dominio Fc de IgG humana específico, Jackson ImmunoResearch). Esto se incubó a RT durante 1hr y las placas se lavaron de nuevo. Las señales de ELISA se desarrollaron en todos los pocillos añadiendo 50 µL de sustrato Sureblue TMB (KPL Inc) e incubando durante 5-20 min. La reacción de HRP se paró añadiendo 50 µL de H2SO4 2N (VWR) y las señales de absorbancia a 450 nm se leyeron en un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices) o EnVision (PerkinElmer). Los datos se exportaron a Excel (Microsoft) y se representaron en GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

Residuos S67, R95, e I97 como determinantes de la reactividad cruzada de cvno: los datos de unión mostrados en la Figura 18 muestran claramente que los residuos S67, R95, e I97 afectan la reactividad cruzada de cyno de varios anticuerpos. Aunque la mutación de cyno a humano P67S impacta negativamente en la unión de CPA.7.002 y CPA.7.041, la mutación de cyno a humano L95R/T97I mejora significativamente la unión de CPA.7.002, CPA.7.021, CPA.7.028, y CPA.7.041. Por otra parte, la mutación de cyno a humano H61R no afecta la unión de ninguno de los anticuerpos ensayados.

La unión relativa de las variantes cyno a humano sugiere tres grupos de epítopos: la unión relativa de los anticuerpos a las variantes de PVRIG de cyno, humana e híbrida sugiere 3 grupos de epítopos distintos: el Grupo 1 se une a los residuos R95/I97 (CPA.7.021 y CPA.7.028). El Grupo 2 se une a los residuos S67 y R95/I97 (CPA.7.002 y CPA.7.041). El Grupo 3 no se une a los residuos S67 o R95/I97 (CPA.7.024 y CP A.7.050). Los grupos de epítopos muestran una fuerte correlación en el grado de reactividad cruzada de cyno de estos anticuerpos (Figura 19).

Resumen y conclusiones: el mapeo de epítopos restringido sobre la base de las variaciones cyno a humano en el ECD de PVRIG identificó a los residuos S67, R95, e I97 como determinantes de la reactividad cruzada de cyno de los anticuerpos anti-PVRIG humano. La restauración completa de la unión a PVRIG de cyno L95R/T97I para los anticuerpos CPA.7.021 y CPA.7.028 y la unión mejorada de CP A.7.002 a este mutante sugiere fuertemente que los residuos R95 e I97 son epítopos críticos de PVRIG humano para estos anticuerpos. Estos descubrimientos también sugieren una manera posible para predecir la reactividad cruzada frente a ortólogos de PVRIG de primates no humanos en su secuencia de aminoácidos primaria.

E. Ejemplo 5: anticuerpos humanizados: análisis de la unión y del bloqueo receptor-ligando de anticuerpos derivados de hibridoma anti-PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P)

Este experimento de realizó para caracterizar la unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) a la proteína PVRIG humana y de cynomolgus en líneas celulares y leucocitos primarios, para caracterizar la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) de bloquear la interacción entre PVRIG y PVRL2 y para caracterizar el espacio de epítopos de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) uno respecto al otro, evaluando la competición para la unión al antígeno PVRIG expresado en las células Jurkat.

Análisis por FACS de células que sobreexpresan hPVRIG: se usaron las siguientes líneas celulares para evaluar la especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P): HEK parental y células HEK que sobreexpresan hPVRIG. Estas células se cultivaron en DMEM (Gibco) + suero fetal de ternera al 10 % (Gibco) + glutamax (Gibco). Para las células HEK que sobreexpresan hPVRIG, también se añadieron 0,5ug/ml de puromicina (Gibco) al medio para una selección positiva. Para el análisis por FACS, todas las líneas celulares se recogieron en la fase logarítmica de crecimiento y se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. La unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus controles respectivos se evaluó en una serie de titulación de 8 puntos empezando en 10ug/ml en hielo durante 30 min-1 hr. La serie de titulación se realizó como diluciones seriadas de 3 veces. Los anticuerpos primarios no conjugados se detectaron con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647 (Jackson Laboratories). Los datos se adquirieron usando un FACS Canto II (BD Biosciences), FACS LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences), o IntelliCyt (IntelliCyt Corporation) y se analizaron usando software FlowJo (Treestar) y Prism (Graphpad).

Análisis por FACS de líneas celulares humanas para determinar hPVRIG: se usaron las siguientes líneas celulares para evaluar la expresión y especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P): células Jurkat y HepG2. Las células Jurkat se cultivaron en medio RPMI + suero fetal de ternera al 10 %, glutamax, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato de sodio (Gibco), y penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células HepG2 se cultivaron en DMEM + suero fetal de ternera al 10 % + glutamax. Para el análisis por FACS, todas las líneas celulares se recogieron en la fase logarítmica de crecimiento y se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. La unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus controles respectivos se

evaluó en una serie de titulación de 8 puntos empezando en 10ug/ml en hielo durante 30 min-1 hr. Los anticuerpos primarios no conjugados se detectaron con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647. La serie de titulación se realizó como diluciones seriadas de 3 veces. Los datos se adquirieron usando un FACS Canto II o IntelliCyte y se analizaron usando software FlowJo y Prism.

Análisis por FACS de PVRIG en células T CD8 expandidas con CMV: los donantes reactivos para CMV se adquirieron en Cellular Technology Limited (CTL). Las PBMC suministradas se pulsaron durante 2 horas con péptido 494-503 de CMV 10uM (NLVPMVATV, Anaspec). Las PBMC se lavaron posteriormente tres veces, después de lo cual se sembraron en placas de 24 pocillos durante 9 días en RPMI + suero AB humano al 10 % (Sigma), glutamax, penicilina/estreptomicina, y una mezcla de crecimiento de citoquinas que consistió en 2ng/ml de IL-2 (R&D systems) y 10ng/ml de IL-7 (R&D systems). Después de 9 días, se recogieron las células no adherentes, se fenotiparon para determinar el enriquecimiento en células T CD8, y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Para evaluar la expresión en células T CD8 expandidas con CMV, se evaluó la unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus controles respectivos en una serie de titulación de 8 puntos empezando en 666nM en hielo durante 30 min-1 hr. La serie de titulación se realizó como una serie de dilución seriada de 4 veces. Los anticuerpos primarios no conjugados se detectaron con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647. Los datos se analizaron usando software FlowJo y Prism y se recogieron en un BD LSR Fortessa X-20.

Análisis por FACS de células preparadas por ingeniería para sobreexpresar PVRIG de cynomolgus: se usaron las siguientes líneas celulares para evaluar la reactividad cruzada de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con PVRIG de cynomolgus (cPVRIG): células expi parentales y expi que sobreexpresan cPVRIG. Estas células se cultivaron en DMEM + suero fetal de ternera al 10 % + glutamax. Las células expi que sobreexpresan cPVRIG de forma transitoria se generaron electroporando ADN de cPVRIG en células expi parentales usando el sistema de transfección Neon. Para el análisis por FACS, las células expi cPVRIG se usaron entre 1-3 días después de la transfección. Las células expi parentales se recogieron en la fase logarítmica de crecimiento. Se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo de cada tipo en placas de 96 pocillos. La unión de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus controles respectivos se evaluó en una serie de titulación de 8 puntos empezando en 10ug/ml en hielo durante 30 min-1 hr. La serie de titulación se realizó como una serie de dilución de 3 veces. Los anticuerpos primarios no conjugados se detectaron con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647. Los datos se adquirieron usando un FACS Canto II o IntelliCyte y se analizaron usando software FlowJo y Prism.

Ensayos de bloqueo receptor-ligando basados en células: se evaluó la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para inhibir la interacción de PVRIG con su ligando PVRL2 en un ensayo de competición celular realizado en dos orientaciones.

En la primera orientación, PVRL2 se expresa de forma endógena en células HEK no manipuladas, y se midió la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) de bloquear la unión de Fc de PVRIG biotinilado soluble a células HEK. Más específicamente, la proteína Fc de PVRIG biotinilada (33nM) y CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (1,03-198 nM, hIgG4) se añadieron concomitantemente a 100.000 células HEK y se incubaron durante 1 hora en hielo. El grado de unión de Fc de PVRIG biotinilado se detectó posteriormente por la adición de estreptavidina Alexa 647 (Jackson Laboratories) durante 20-30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces en PBS para la adquisición usando un FACS Canto II. Los datos se analizaron usando Flow Jo, Excel (Microsoft), y Prism.

En la segunda orientación, las células HEK se prepararon por ingeniería para expresar PVRIG humano (HEK hPVRIG) y se evaluó la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) para inhibir Fc de PVRL2 humano soluble. Más específicamente, las células HEK hPVRIG se preincubaron con CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (0,66-66nM) durante 30 min en hielo, después de lo cual se añadió PVRL2 mFc (PVRL2 humano con un Fc de ratón) (durante 1 hr en hielo) y se midió su capacidad de unirse a HEK hPVRIG. El grado de la unión de PVRL2 mFc se detectó por la adición posterior de anti-Fc de ratón de cabra A647 (Jackson Laboratories) durante 20-30 min en hielo. Las células se lavaron dos veces en PBS para la adquisición usando un FACS Canto II. Los datos se analizaron usando FlowJo, Excel y Prism.

Análisis espacial de los epítopos basado en células: el espacio de los epítopos para CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) se evaluó por su capacidad de competir con el otro para la unión a las células Jurkat. Brevemente, las células Jurkat se recogieron en la fase logarítmica de crecimiento y se tiñeron con □□□g/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) no marcados durante 30 min en hielo. Las células Jurkat se centrifugaron posteriormente, se lavaron, y se contratiñeron con □□g/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) marcados con Alexa 647 durante 30 min en hielo. La competición de los anticuerpos marcados para la unión de PVRIG con anticuerpos no macados en células Jurkat se evaluó por la magnitud de la señal de Alexa 647 por citometría de flujo. Los datos se adquirieron usando un FACS Canto II y se analizaron usando FlowJo, Excel, y Prism.

Resultados

CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) reconocen PVRIG en células con sobreexpresión, células Jurkat, y células T humanas: la capacidad de los anticuerpos frente a PVRIG derivados de hibridoma humanizados CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para unirse a PVRIG humano se evaluó usando células HEK que sobreexpresan PVRIG humano, células Jurkat, y células T primarias. La Figura 20 ilustra la especificidad tanto de CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) como de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B). Ambos anticuerpos se unen de una forma altamente específica a las células HEK hPVRIG, y no se unen a las células parentales HEK.

Afinidades de unión: tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también presentan unión a las células HEK hPVRIG con ata afinidad con sus valores de Kd asociados: 0,29 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 0,86 nM para CHA7.538.1.2 para la unión a las células HEK hPVRIG.

La Figura 21 ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B) de unirse a células Jurkat que expresan de forma endógena PVRIG. Ambos son capaces de unirse a las células Jurkat con una afinidad comparable a las células HEK hPVRIG.

La afinidad de estos anticuerpos para las células Jurkat son 0,15 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 0,59 nM para CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

La Figura 22 ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) de unirse a las células T CD8 que se expandieron por exposición al péptido de CMV (494-503, NLVPMVATV) y que expresan de forma endógena PVRIG.

CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) detectan PVRIG de cynomolgus (cPVRIG) expresado en células expi: la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) de unirse a cPVRIG se evaluó usando células expi que sobreexpresan cPVRIG. La Figura 23 ilustra la especificidad tanto de CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) como de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B). Ambos anticuerpos se unen de una forma altamente específica a las células expi cPVRIG, y no se unen a las células parentales expi. Tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también presentan unión a las células expi cPVRIG con alta afinidad con sus valores Kd asociados de 0,24 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 0,58 nM para CHA7.538.1.2.

Ensayos de bloqueo receptor-ligando basados en células: la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para inhibir la interacción de PVRIG con PVRL2 se evaluó en dos orientaciones, como se indica en la sección de protocolos. En la primera permutación, tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) fueron capaces de inhibir completamente la unión de PVRIG Fc a las células HEK (Figura 24 A). Los valores de CI50 asociados con esta capacidad de bloqueo son 15 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 16,1 nM para CHA.7.538.1.2.H4(S241P). De forma importante, no todos los anticuerpos derivados de la campaña de hibridoma que se confirmó que se unían a PVRIG fueron capaces de bloquear la unión de PVRIG Fc a las células HEK. Como se muestra en la Figura 24B, un clon de anticuerpo designado CHA.7.544 es incapaz de bloquear la unión de PVRIG Fc a las células HEK.

En la segunda permutación, tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también fueron capaces de inhibir completamente la unión de PVRL2 Fc a las células HEK hPVRIG (Figura 25A). Los valores de CI50 asociados con esta inhibición son 1,8 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 2,53 nM para CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Aunque la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) fueron capaces de inhibir completamente la unión de PVRL2 Fc en esta permutación, consistente con su capacidad de inhibir a unión de PVRIG Fc en la primera permutación, otros anticuerpos no mostraron esta misma tendencia. Más específicamente, otro anticuerpo derivado de hibridoma humanizado, CHA.7.530.3, que fue capaz de inhibir completamente la unión de PVRIG Fc a las células HEK (primera permutación, datos no mostrados), no fue capaz de inhibir completamente la unión de PVRL2 Fc a las células HEK hPVRIG (Figura 25A). Colectivamente, estos datos indican que la segunda permutación del ensayo de bloqueo receptor ligando basado en células es capaz de distinguir la potencia de los anticuerpos de bloqueo receptor-ligando con más sensibilidad en comparación con la primera permutación. De forma importante, se mostró que CHA.7.544 era incapaz de bloquear la unión de PVRL2 Fc a las células HEK hPVRIG (Figura 25 B) consistente con su incapacidad de bloquear la unión de PVRIG Fc a las células HEK.

Análisis espacial de epítopos basado en células: como se indica en la sección de protocolos, se realizó un análisis del espacio de epítopos de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) evaluando su capacidad de competir para la unión a PVRIG. La Figura 26 muestra la capacidad de versiones no conjugadas de los anticuerpos para inhibir la unión de las versiones conjugadas con Alexa 647 (A647) de los mismos anticuerpos. Los datos de la Figura 26 representan el porcentaje de unión de los anticuerpos conjugados con A647 respecto a la señal máxima que rinden sin competición. La señal que rinden CHA.7.518.1.H4(S241P) A647 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) A647 no se vio afectada por la preincubación de las células Jurkat con control de isotipo (datos no mostrados). Como se esperaba, la señal que rindieron CHA.7.518.1.H4(S241P) A647 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) A647 estuvo reducida significativamente cuando competían con las versiones no conjugadas de sí mismos (datos no mostrados). De forma interesante, después del análisis de la señal de A647 de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) en el contexto de preincubación con la versión no conjugada del anticuerpo opuesto, también hubo una reducción significativa. Esto indica que CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) pueden compartir un espacio de epítopo similar en PVRIG expresada de forma endógena.

Resumen y conclusiones: las versiones de ratón de los anticuerpos anti-PVRIG designados CHA.7.518 y CHA.7.538 se humanizaron con éxito en un isotipo IgG4 humano (CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P)) que retuvieron las propiedades de unión frente al antígeno PVRIG humano. Usando células con sobreexpresión preparadas por ingeniería, Jurkat, y células T CD8 primarias expandidas con CMV, se mostró que CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) eran altamente específicos para PVRIG humano endógeno y se unían con alta afinidad. Además, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también mostraron reactividad frente al antígeno PVRIG de cyno y se unieron a células con sobreexpresión con alta afinidad. Funcionalmente, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) fueron capaces de inhibir la interacción de PVRIG con PVRL2 en ensayos basados en FACS. Por último, se mostró que CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) comparten potencialmente un espacio de epítopo en PVRIG humano endógeno, debido a su capacidad de competir el uno con el otro para la unión a las células Jurkat.

F. Ejemplo 6: anticuerpos humanizados: análisis funcional de anticuerpos humanizados

Se validó la actividad funcional de varios anticuerpos humanizados de la invención.

Ensayo CHO-S OKT3: se utilizó el ensayo CHO-S OKT3 para determinar si los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), podían aumentar la proliferación de las células T CD4+ y CD8+, y la secreción de citoquinas. Las células diana usadas en el ensayo de cocultivo fueron la línea celular de ovario de hámster chino, CHO-S (ATCC), que sobreexpresan de forma estable el fragmento variable de cadena única del anticuerpo anti-CD3 humano Clon OKT3 (abreviado como OKT3), o que sobreexpresan de forma estable tanto OKT3 como PVRL2 humano (abreviado como hPVRL2). Las células parentales CHO-S OKT3 se crecieron en medio CD-CHO sin suero (Gibco) suplementado con glutamax 40mM (Gibco), penicilina/estreptomicina (Gibco), y 6µg/ml de puromicina (Gibco). Las células CHO-S OKT3 hPVRL2 se crecieron en el mismo medio CD-CHO que las células parentales, pero también suplementado con 600µg/ml de higromicina B (Gibco).

Se aislaron células T CD4+ y CD8+ primarias de donantes humanos sanos usando la mezcla de enriquecimiento de células T CD4+ humanas RosetteSep™ (Stemcell Technologies), y los microlechos de CD8+ humano (Miltenyi Biotec), respectivamente, y se congelaron en nitrógeno líquido. En el día del ensayo del cocultivo, las células T CD3+ o CD8+ se descongelaron, se contaron, y se marcaron con CFSE 1µM (Life Technologies) durante 10 minutos a 37 °C. Después de esta incubación, las células T se lavaron y se resuspendieron en medio completo que contenía RPMI (Gibco), suplementado con FBS inactivado con calor al 10 %, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato de sodio (Gibco), y β-mercaptoetanol 50µM (Gibco). Las células CHO-S OKT3 y CHO-S OKT3 hPVRL2 se recogieron del cultivo, y se trataron con mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37 °C con mezclado periódico. Después de la incubación, las células diana se lavaron concienzudamente, se contaron, y se resuspendieron en medio completo RPMI. El ensayo se estableció con una relación 5:1 de células T (100.000) a células diana (20.000). Las células diana, células T, y 10µg/ml de cada tratamiento con anticuerpo se añadieron conjuntamente a una placa de fondo en U de 96 pocillos (Costar), y se incubó bien durante 3 días (células T CD8+), o 5 días (células T CD4+) a 37 °C. Los tratamientos con anticuerpo frente a PVRIG incluyeron IgG4 CHA.7.518.1.H4(S241P) humano, IgG4 CHA.7.538.1.2.H4(S241P), IgG4 CHA.7.530.3 humano (anticuerpo de bloqueo parcial receptor/ligando), e IgG1 CHA.7.544 de ratón (anticuerpo no de boqueo receptor/ligando). Además de los anticuerpos frente a PVRIG, también se evaluó la actividad de anti-DNAM-1 humano de ratón (Clon DX11, BioLegend), control de isotipo de IgG1 de ratón (Clon MOPC21, BioLegend), y un control de isotipo de IgG4 humana. Para las titulaciones de las dosis de anticuerpo, se utilizaron diluciones de 3 veces de 66nM a 0,264nM de los anticuerpos frente a PVRIG, y el anticuerpo de control de isotipo respectivo.

Después del periodo de incubación de 3 o 5 días, los sobrenadantes de los cocultivos se analizaron para determinar citoquinas secretadas, incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNFα, e IFNγ, con el kit de citoquinas Th1/Th2/Th17 de matriz de lechos citométricos (CBA) humano (BD Biosciences), o con el kit de citoquinas Th humano LEGENDplex™ (BioLegend). La proliferación de las células T se midió por tinción de las células T CD4+ o CD8+ con el kit de tinción LIVE/DEAD fixable aqua (ThermoFisher Scientific), anticuerpo anti-CD4 (Clon RPA-T4, BioLegend), y anticuerpo anti-CD8 (Clon HIT8a, BioLegend), y seleccionando el porcentaje de células T CD4+ o CD8+ proliferantes vivas, con CFSE bajo. Los datos se adquirieron usando un FACS Canto II (BD Biosciences), y se analizaron usando software Flow Jo (Treestar) y Prism (Graphpad).

Resultados

CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(ˈS241P) aumentan la proliferación de las células T CD4+ de una manera dependiente de hPVRL2: la capacidad de los anticuerpos frente a PVRIG derivados de hibridoma humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2. H4(S241P), para aumentar la proliferación de las células T CD4+ primarias in vitro se evaluó con el ensayo CHO-S OKT3. La Figura 27A muestra el porcentaje de células T CD4+ proliferantes de un donante representativo en respuesta al cocultivo con las células diana CHO-S OKT3 hPVRL2 y diferentes anticuerpos frente a PVRIG. En este donante, los anticuerpos humanizados CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) incrementan la proliferación de las células T CD4+ en comparación con el control de isotipo de IgG4 humana (línea punteada). El anticuerpo de bloqueo parcial receptor/ligando, IgG4 CHA.7.530.3 humano, solo aumenta débilmente la proliferación de las células T, mientras que el anticuerpo no bloqueante receptor/ligando, IgG1 CHA.7.544 de ratón no tiene efecto en comparación con los anticuerpos de control de isotipo. El anticuerpo anti-

DNAM-1 reduce la proliferación de las células T CD4+. La Figura 27B demuestra que los efectos de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), y el anticuerpo anti-DNAM-1 dependen de la sobreexpresión de hPVRL2 en las células diana. Después del tratamiento con los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.1, se observa un mayor incremento en la proliferación de las células T CD4+ cuando las células T CD4+ se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2, en comparación con el cocultivo con las células parentales CHO-S OKT3. De forma similar, el anticuerpo anti-DNAM-1 solo disminuye la proliferación de las células T CD4+ cuando las células T se cocultivan con las células CHO-S OKT3 que sobreexpresan hPVRL2.

CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentan la proliferación de las células T CD8+ y la secreción de IFN-g: la Figura 28A-B ilustran la capacidad de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), para incrementar la proliferación de las células T CD8+ en el ensayo CHO-S OKT3. En dos diferentes donantes humanos de células T CD8+, los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) incrementan la proliferación de las células T CD8+ en comparación con el control de isotipo de IgG4 humana cuando las células T se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. Sin embargo, la IgG1 CHA.7.544 de ratón tiene un efecto de pequeño a ausente. Como se observa con las células T CD4+, el anticuerpo anti-DNAM-1 reduce la proliferación de las células T CD8+. La Figura 28C muestra que los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), también aumentan la secreción de IFNγ en el ensayo CHO-S OKT3. En tres diferentes donantes humanos de células T CD8+, los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) incrementan la producción de IFNγ en comparación con el control de isotipo de IgG4 humana (línea punteada). También se observaron incrementos en IL-10, IL22 y TNFα después del tratamiento con los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (datos no mostrados).

CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentan de forma consistente la proliferación de las células T CD4+ en múltiples donantes humanos: a continuación, para demostrar que los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) podrían aumentar de forma reproducible la función de las células T, se examinaron los efectos de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados en la proliferación de las células T CD4+ en 11 donantes diferentes en el ensayo CHO-S OKT3. La Figura 29 demuestra que tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2. H4(S241P) incrementaron de forma consistente la proliferación de las células T CD4+ en la mayoría de los donantes ensayados en comparación con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano cuando las células T se cocultivaron con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. Además, el anticuerpo de bloqueo parcial receptor/ligando, CHA.7.530.3, y el anticuerpo no bloqueante receptor/ligando, CHA.7.544, no aumentan de forma consistente la proliferación de las células T CD4+ en los mismos donantes.

CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) tienen un efecto dependiente de la dosis en la proliferación de las células T CD4+ y CD8+: finalmente, se midió el efecto dependiente de la dosis de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), en el ensayo CHO-S OKT3. La disminución de la dosis de los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) disminuye el porcentaje de la proliferación de las células T CD4+ (Figura 30A), y células T CD8+ (Figura 30B) cuando las células T se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. Este efecto dependiente de la dosis sobre la proliferación de las células T no se observa con el anticuerpo CHA.7.544, ni con el control de isotipo IgG4. Además, no se observó un efecto bifásico con la titulación de la dosis, lo que sugiere una ausencia de actividad agonista de los anticuerpos frente a PVRIG humanizados.

Resumen y conclusiones

Los anticuerpos frente a PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), tuvieron una actividad funcional in vitro en el ensayo CHO-S OKT3 basado en células primarias. Tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) incrementaron la proliferación de las células T CD4+ y CD8+ de una manera dependiente de la dosis. CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también fueron capaces de aumentar la secreción de IFNγ en el ensayo CHO-S OKT3. Sr mostró que la actividad de los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) era dependiente de la sobreexpresión de hPVRL2 en las células diana. CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentaron de forma consistente la actividad de las células T en múltiples donantes humanos, mientras el anticuerpo no bloqueante CHA.7.544 tuvo un efecto de pequeño a ausente.

G. Ejemplo 7: desarrollo de anticuerpos monoclonales de rata para PVRIG de ratón

El desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb) de rata se realizó en Aldevron Freiburg (Alemania). Los anticuerpos frente a la proteína PVRIG de ratón se incitaron usando la tecnología de inmunización con ADN. Se introdujo un vector de inmunización que expresa PVRIG de ratón en el organismo huésped (rata). Se expresó PVRIG de ratón, y se generó una respuesta a la inmunización. La identificación de antisueros positivos y el cribado de hibridomas se analizaron en células que expresan de forma transitoria PVRIG de ratón.

Generación de pAb de rata anti-PVRIG de ratón

El desarrollo de anticuerpos policlonales de rata frente a la proteína PVRIG de ratón incluyó la clonación del dominio extracelular de PVRIG de ratón en el vector de inmunización patentado Aldevron, y la clonación de la longitud completa y el dominio extracelular en vectores de cribado patentados Aldevron. Los diferentes vectores de expresión usados para las inmunizaciones y para el cribado se confirmaron por FACS en células que expresan de forma transitoria PVRIG de ratón. Se inmunizaron entonces tres ratas con el vector de inmunización. Se tomaron los sueros inmunes y los sueros diluidos se ensayaron por FACS usando células transfectadas de forma transitoria con los vectores de cribado. Se recogieron de cada rata sangrados de producción, y se realizó una purificación usando proteína-A.

Generación de mAb de rata anti-PVRIG de ratón

Se realizó la fusión de linfocitos de rata y la selección usando sistemas de ensayo de Aldevron. Esto incluyó: la fusión de 20 x placas de 96 pocillos seguido de un cribado inicial por ELISA Basado en Células (cELISA), en células transfectadas de forma transitoria con ECD (dominio extracelular) de PVRIG de ratón o FL (longitud completa). Se propagaron adicionalmente 108 clones positivos (unidos a células que expresan ECD de PVRIG de ratón/FL) y se volvieron a ensayar. Se propagaron 30 clones positivos en matraces T-25 y los sobrenadantes se ensayaron en un ELISA basado en células. Se seleccionaron 23 clones de hibridoma para subclonación adicional. El sobrenadante sin suero se ensayó por cELISA y por FACS. Se generó un total de 21 clones y la unión se confirmó en células que sobreexpresan la proteína PVRIG de ratón.

Caracterización de los Ab

La unión de los sangrados de ensayo de anti-PVRIG de ratón de rata, pAb purificados, sobrenadantes preclonales y clonales, así como los mAb purificados, se analizó por citometría de flujo, usando células HEK293 que sobreexpresan de forma estable PVRIG de ratón. También se ensayó la unión de los anticuerpos a las células D10.G4.1 que expresan de forma endógena PVRIG de ratón. Se confirmó la expresión específica en la superficie celular de PVRIG de ratón. Las células (1-2x10^5) se tiñeron con tinción de viabilidad Fixable diluida 1:1.000 en PBS, durante 10 min a R.T. seguido del lavado de las células con PBS. Los Ab se añadieron entonces a las células (diluidos en tampón de FACS) seguido de la tinción con anti-rata de cabra-PE (diluido 1:100 en tampón de FACS).

La especificidad de los mAb se ensayó por ARNsi para la transfección de PVRIG de la línea celular D10.G4.1 que expresa de forma endógena PVRIG de ratón. Se observó una reducción en la superficie celular después de la inactivación de PVRIG de ratón.

La unión de los mAb a las células NK también se ensayó por FACS.

El ensayo de preclasificación se realizó para demostrar la diversidad de los mAb.

La afinidad de los mAb purificados (Kd) se determinó por titulación de FACS en células estables que sobreexpresan PVRIG de ratón frente a células transducidas con vector vacío, y en la línea celular D10.G4.1. Las células (1x10^5) se tiñeron con tinción de viabilidad Fixable diluida 1:1.000 en PBS, durante 10 min a RT seguido del lavado de las células con PBS. Los Ab se añadieron entonces a las células (8 concentraciones-dilución seriada 1:3, 10-0,01µg/ml diluido en tampón de FACS) seguido de la tinción con anti-rata de cabra-PE (diluido 1:100 en tampón de FACS).

Caracterización de los mAb-Tabla resumen

La Tabla 7 (columnas 1-10) resume los datos generados para la caracterización de los anticuerpos anti-PVRIG de ratón.

- La columna 1 representa la ID del código del Ab
- La columna 2 representa el nombre del Ab proporcionado por Aldevron
- La columna 3 representa los datos de FACS como relación MFI en células con sobreexpresión de forma estable sobre las células transducidas con vector vacío a una concentración de mAb de 10µl/ml
- La columna 4 representa la afinidad (nM) en las células HEK con sobreexpresión
- La columna 5 representa la unión a células NK a una concentración de mAb de 10µl/ml
- La columna 6 representa la relación MFI de unión de la línea celular D10.G4.1 sobre el control de isotipo
- La columna 7 representa afinidad (nM) a la línea celular D10.G4.1
- La columna 8 representa las diferentes clases en el ensayo de preclasificación de epítopos
- La columna 9 representa el ensayo de % de bloqueo Receptor-Ligando (unión de la proteína de fusión PVRIG de ratón-Fc a células que sobreexpresan PVRL2 de ratón) y CI50 (nM)
- La columna 10 representa el ensayo de % de bloqueo Receptor-Ligando (unión de la proteína de fusión PVRL2 de ratón-Fc a células que sobreexpresan PVRIG de ratón) y CI50 (nM)

Los AB-406 y AB-407 demostraron una actividad bloqueante en ambos ensayos de unión Receptor-Ligando tienen una afinidad relativa alta, se une a células NK y D10.G4.1.

Estos Ab se seleccionaron para determinar la expresión de TME y para estudios in vivo.

Tabla 7. Caracterización de los Ab monoclonales anti-PVRIG de ratón.

ID LIMS	Nombre del Ab	MFIr (HEK OX\EV) 10ug/ml	Kd (nM) En células OX	Expresión en NK MFIr (Ab\Iso)	Expresión en D10.G4.1 MFIr (Ab\Iso)	Kd (nM) En Células D10.G4.1	Pre clasificación de Epítopos	% de bloqueo R-L (029-Fc) (CI50)	% de bloqueo R-L (mPVRL2-Fc) (CI50)
AB-400	BOI-1F11-H6	10	0.1393	NT	13.2	35.68	1	Agonista	Agonista
AB-401	BOI-3E2-F4	55.7	2.4	NT	7.5	NT	1	Agonista	Inconsistente
AB-402	BOI-4F11-H6	4.8	0.08974	NT	20	NT	1	Agonista	Agonista
AB-403	BOI-4G1-E3	28	57.64	-	2	NT	4	78% (2.782)	Inconsistente
AB-404	BOI-4H8-E3	18.6	0.386833	1.5	6.8	NT	1	Inerte	90-98%
AB-405	BOI-5A4-E3	13.5	0.08871	NT	6.7	4.536	1	Agonista	Agonista
AB-406	BOI-5C2-B3	54.5	1.884667	2.2	10	8.577	3	77% (3.679)	97-100%
AB-407	BOI-5G4-F4	50	0.334427	2.8	8	1.325	3	95% (3.992)	95-100%
AB-408	BOI-8G1-G1	18.9	5.098	1.7	8	NT	4	90% (3.585)	Agonista
AB-409	BOI-9B1-D9	24.8	0.1555	NT	10	NT	1	Agonista	Inconsistente
AB-410	BOI-11C2-G9	16.6	0.2218	2.4	6.8	NT	1	Agonista	Inconsistente
AB-411	BOI-12E2-F8	36	5.3405	NT	5.4	NT	3	94% (4.311)	98-100% (1.189)
AB-412*	BOI-14H2-F4	3.3*	NT	NT	2	NT	2	Agonista	62-67% (23.87)
AB-413*	BOI-15B3-E11	49.3	1.09345	2.1	12	4.693	3	73% (2.836)	95-100% (0.58)
AB-414	BOI-15F8-C6	24.8	2.0395	1.6	8.5	18.48	3	90% (2.907)	95-100% (1.154)
AB-415	BOI-16E7-G8	24	17.573	2.2	5	NT	5	95% (8.727)	93-100% (5.643)
AB-416	BOI-17C4-D4	26.3	6.357	1.5	5	NT	1	Inerte	92-94% (1.963)
AB-417*	BOI-17C7-H5	15	59.16	-	2.5	NT	4	72% (3.455)	Inerte
AB-418	BOI-18C1-C10	64.8	62.98	NT	4.4	NT	5	94% (18.18)	100% (8.055)
AB-419	BOI-18D2-F5	17	0.3169	1.5	6.3	NT	1	Agonista	57-64%
AB-420	BOI-1909-C7	33.6	3.172	1.2	20	NT	4	78% (9.805)	Agonista

H. Ejemplo 8: ensayo de la combinación con inhibidores adicionales de los puntos de control inmunes

Antecedentes

Aunque el bloqueo con anticuerpos de las rutas CTLA4 y PD1 ha surgido como una modalidad de tratamiento del cáncer efectiva, la mayoría de los pacientes no obtienen un beneficio a largo plazo, lo que sugiere una necesidad de tomar como diana puntos de control inmunes adicionales. Mediante el empleo de nuestros únicos algoritmos computacionales para definir nuevos miembros de la familia B7/CD28, identificamos PVRIG, que se expresa por múltiples subconjuntos de células T y NK. Reportamos aquí su patrón de expresión, caracterización funcional, y actividad antitumoral de anticuerpos bloqueantes dirigidos a esta molécula.

Métodos

Mediante la utilización de la plataforma de Descubrimiento Predictivo, se identificó PVRIG como un nuevo punto de control inmune potencial, después de lo cual se usó una biblioteca de cribado celular retroviral para identificar su contraparte de unión cognada. Se evaluaron los efectos dirigidos en la modulación de las células T con ensayos de células T primarias y derivadas de tumor, tomando ventaja de la sobreexpresión, inactivación de la diana, y estrategias de anticuerpos antagonistas. Los anticuerpos frente a la proteína humana se cribaron para determinar su capacidad de aumentar la activación de las células T in vitro, mientras los anticuerpos dirigidos al ortólogo de ratón se evaluaron in vivo para determinar sus efectos en la inhibición del crecimiento tumoral en modelos singénicos.

Resultados

Se encontró que una proteína de fusión PVRIG-Fc se unía a PVRL2, con una especificidad de unión confirmada tanto por ELISA como por análisis por citometría de flujo. PVRIG demostró una cinética de expresión única en la activación de las células T, con detección de la diana en las células T de memoria, así como en células NK y células T γδ. Se generó un panel de anticuerpos humanos de alta afinidad con la capacidad de bloquear la interacción de PVRIG con PVRL2, que cuando se ensayaron in vitro mostraron que aumentan la activación tanto de células T CD4+ primarias como CD8+ derivadas de tumor a través de un mecanismo dependiente de PVRL2.

Como CHA.7.518.1.H4(S241P) no tiene reactividad cruzada con ratón, se llevaron a cabo estudios in vivo con un anticuerpo anti-PVRIG de ratón bloqueante sustituto. Cuando se combina con el bloqueo anti-PDL-1, anti-PVRIG de

ratón inhibe el crecimiento de tumores establecidos en los dos modelos de cáncer colorrectal CT26 y MC38. El ensayo de la combinación con inhibidores de puntos de control inmunes adicionales, así como en ratones con PVRIG inactivado, están en curso.

Conclusiones

El anticuerpo antagonista de alta afinidad es capaz de aumentar la activación de las células T humanas, y un anticuerpo sustituto con características similares muestra sinergia con PD-L1 in vivo en múltiples modelos singénicos. Globalmente, nuestros datos demuestran la utilidad de tomar como diana PVRIG además de otros puntos de control de la familia B7 para el tratamiento del cáncer.

I. Ejemplo 9: estudio poc *in vivo*: eficacia de los mAb anti-MPVRIG en el modelo tumoral CT26

Este ejemplo describes la eficacia del tratamiento con mAb anti-mPVRIg en el modelo de carcinoma de colon murino CT26 como monoterapia o en combinación con el tratamiento con anti-PDL-1.

Materiales y Métodos

Experimentos de pulso tumoral:

El carcinoma de colon CT26 se adquirió en la ATCC (CRL-2638). Las células se cultivaron en RPMI 1640 (Biological Industries, 01-100-1A) con FBS al 10 % (Biological Industries, 04-127-1A), y 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Biological Industries, 03-031-1B). Para la implantación de los tumores, las células se recogieron y se lavaron, se contaron y se suspendieron hasta 10^7 células/ml en RPMI 1640 frío y se pusieron en hielo. Se anestesiaron ratones BALB/c ((hembras, 8sem) Envigo), con una mezcla de Ketamina al 10 % (Clorketam; SAGARPA Q-7090-053) y Xilazina al 10 % (Sedaxylan; BE-V254834) inyectada por vía intraperitoneal. A continuación, la espalda de los ratones se afeitó y se desinfectó con una disolución de etanol al 70 %. Se inyectaron células tumorales como 50µl de $5x10^5$ células CT26 subcutáneamente en el flanco posterior derecho de los ratones. La administración de los mAb empezó en el día 4 (Monotratamiento) o en el día 7 (Tratamiento combinado) después de la inoculación de los tumores cuando los tumores tenían un volumen de 30-50mm^3 (Monotratamiento) o alcanzaron el volumen de 60-90mm^3 (Tratamiento combinado); y se proporcionaron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen final/inyección de 200ul, durante 3 semanas para un total de 6 administraciones. El crecimiento tumoral se midió con un calibrador electrónico cada 2-3 días y se reportó como 0,5 X W^2 X L mm^3. Los ratones se sacrificaron con CO_2 bien al término del estudio o en cualquiera de los siguientes puntos finales clínicos: volumen tumoral ≥2.250 mm^3, ulceración tumoral, pérdida de peso corporal ≥ 20%, o apariencia moribunda.

Anticuerpos:

Se mostró que los anticuerpos quiméricos anti-PVRIg de ratón (mAb 406 y mAb 407) usados en este estudio, preparados por ingeniería como un anticuerpo monoclonal (mAb) de isotipo IgG2b de rata se unían a los transfectantes 293HEK que expresan mPVRIg y bloqueaban la unión de mPVRL2 a estas células. El mIgG1 anti-PDL-1 de ratón inhibidor usado en este estudio fue el mAb YW243.55.S70. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anti-PD-L1 descrito en WO 2010/077634 (las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se muestran en las SEQ ID Nos.20 y 21, respectivamente, de WO 2010/077634), y que tiene una secuencia descrita en ella.

Todos los mAb se formularon en PBS estéril y tuvieron niveles bajos de endotoxinas (<0,05 EU/mg).

Tabla 8. mAb ensayados.

1	IgG1 de ratón. k Control de Isotipo (MOPC-21)	BP0083	BioXcell
2	IgG2b de rata, k Control de Isotipo.	BP0090	BioXcell
	(LTF-2,)		
3	anti PDL-1 De referencia	YW243.55.S70	Compugen inc.
	(mIgG1)		
4	mAb anti-CGEN PVRIG 406	BOJ-5C7-B3	ALDEVERON
	(IgG2b de rata)		
5	mAb anti-CGEN PVRIG 407	BOJ-5G4-F4	ALDEVERON
	(IgG2b de rata)		

Diseño del estudio

Monotratamiento

Se adquirieron ratones BALB/c hembras de ocho semanas de edad en Envigo y se mantuvieron en una instalación para animales SPF durante 1 semana antes de empezar el experimento. Los ratones se anestesiaron, se afeitaron y se inocularon subcutáneamente con 50µl de $5X10^5$ células tumorales CT26. En el día 4 después de la inoculación del tumor, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento de n=10 (como se describe más adelante). Los ratones se trataron con los mAb (como se detalla más adelante) inyectados en el día 4, 7, 11, 14, 18 y 21 después de la inoculación. El crecimiento tumoral se midió con calibrador cada 2-3 días.

Tabla 9. Grupos de tratamiento.

No. del grupo	Tratamiento/mAb	Dosis (mg/kg)	No. de dosis	Vol/Dosis (µl)
1	Vehículo		6	200
2	mIgG1 Ctrl iso	5	6	200
3	IgG2b de rata Ctrl iso	10	6	200
4	mIgG1 anti-PDL-1	5	6	200
5	mAb rIgG2b anti-mPVRIg 406	10	6	200
6	mAb rIgG2b anti-mPVRIg 407	10	6	200

Tratamiento combinado

Para las combinaciones de los tratamientos con los mAb anti-mPVRIg y anti-mPDL-1. Los ratones se trataron como se describe en el monotratamiento. En el día 7 después de la inoculación de los tumores, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento de n= 10 como se describe más adelante. Los ratones se trataron con los mAb (como se detalla más adelante) inyectados en el día 7, 11, 14, 18, 21 y 25 después de la inoculación de los tumores.

Tabla 10. Dosificaciones de tratamiento.

No. de grupo	Tratamiento/mAb 1	Dosis (mg/kg)	Tratamiento/mAb 2	Dosis (mg/kg)	No. de dosis	Vol/Dosis (µl)
7	mIgG1 Ctrl iso	5	IgG2b de rata Ctrl iso	10	6	200
8	mIgG1 anti-PDL-1	5	IgG2b de rata Ctrl iso	10	6	200
	mIgG1 anti-PDL-1	5	mAb rIgG2b anti-mPVRIg 406	10	6	200
10	mIgG1 anti-PDL-1	5	mAb rIgG2b anti-mPVRIg 407	10	6	200

Análisis estadístico:

ANOVA de dos vías con mediciones repetidas, seguido de ANOVA de dos vías con mediciones repetidas para pares seleccionados de grupos usando software JUMP (Statistical Discoveries TM). Los análisis de las mediciones del crecimiento tumoral se realizaron comparando los volúmenes tumorales medidos en el último día en el que los animales del estudio estaban vivos. Las diferencias estadísticas en porcentaje de ratones sin tumor se determinaron por un ensayo de rango logarítmico de Mantel-Cox. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Para cada experimento, se describe el número de replicados realizados y el número de animales por grupo en la o las leyendas de las figuras correspondientes (Figuras 47-48).

Resultados

Actividad de la monoterapia de anti-mPVRIg y anti-mPDL-1 en un modelo de tumor CT26 singénico

Empezamos la evaluación preclínica de la monoterapia de anti-mPVRIg y anti-mPDL-1 en un modelo de tumor CT26 singénico de ratón. Tratamos ratones con un anticuerpo de isotipo mIgG1 anti-PDL-1 (YW243.55.S70) o con isotipo rIgG2b anti-mPVRIg (mAb 406 y 407).

En un modelo de tratamiento semiterapéutico de carcinoma de colon CT26, la monoterapia con anti-PDL-1 fue significativamente eficaz (P<0,0001), incitando un 70 % de TGI en comparación con el isotipo control mIgG1, tasas

mayores de rechazo tumoral con un rechazo tumoral rápido e inmunidad antitumoral duradera observada en una mayoría de los ratones (Fig. 63A+B).

Los grupos tratados bien con mAb anti-mPVRIg 406, y mAb anti-mPVRIg 407 mostraron tasas de crecimiento tumoral similares con una TGI no mayor que el isotipo rIgG2b (Fig. 63A+B). Por consiguiente, el tratamiento con mIgG1 anti PDL-1 prolongó la supervivencia de los ratones (P<0,01, Fig. 63C), con 5 de 10 individuos demostrando un aclaramiento completo del tumor (Fig. 63B). No se observó ningún efecto los mAb anti-mPVRIg en las tasas de supervivencia.

Actividad de la combinación de anti-PVRIg y anti-PDL-1 en el modelo de tumor singénico de ratón

A continuación, evaluamos la actividad de la terapia de combinación de anti-PVRIg y anti-PDL-1 en el modelo de tumor singénico de ratón.

En un modelo de tratamiento terapéutico de carcinoma de colon CT26, la administración de anti-PDL-1 con tratamiento de control de isotipo rIgG2b, iniciado en el día 7 después de la inoculación, no fue eficaz, mientras la combinación de mAb anti-PVRIg 407 con anti-PDL-1 incitó una TGI significativa (56 %, P=0,0005), tasas mayores de rechazo tumoral con 4 de 10 individuos demostrando un aclaramiento completo del tumor (Fig, 64A+B) y promovió una mejor actividad antitumoral, con inmunidad antitumoral duradera detectada (P<0,01, Fig. 64C). La combinación de mAb anti-PVRIg 406 con anti-PDL-1 fue parcialmente eficaz, dando lugar a un 33 % de TGI, sin embargo, la respuesta antitumoral registrada fue transitoria y no se observó ningún efecto en la tasa de supervivencia.

Conclusiones

Se predijo que mPVRIg juega un papel como una nueva molécula semejante a B7 y, así, como una diana potencial para la inmunoterapia del cáncer basada en anticuerpos. Varios sistemas experimentales humanos *in vitro* han demostrado un efecto inmunomodulador para mPVRIg. En los estudios presentados en este informe, hemos evaluado el efecto anticanceroso in vivo de mAb dirigidos frente a mPVRIg. En nuestro estudio, el tratamiento con 10mg/kg (200ug/ratón) de anti-mPVRIg como monoterapia en un entorno de enfermedad mínima, es decir, inicio del tratamiento en el día 4 (media del tumor de 40mm^3), no dio lugar a una ventaja en TGI o supervivencia, mientras el mAb de control positivo anti-PDL-1 presentó TGI significativa y dio lugar a una supervivencia prolongada.

También se ensayaron mAb anti-mPVRIg en combinación con tratamiento con anti-PDL-1. El tratamiento con 10mg/kg (200ug/ratón) se inició en el día 7, cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 75mm^3. La terapia de combinación de mAb anti-mPVRIg 407 con anti-PDL-1 en el modelo CT26 terapéutico presentó una inhibición del crecimiento tumoral y una supervivencia prolongada de los ratones tratados. El efecto en el crecimiento tumoral varió entre los ratones individuales con algunos individuos demostrando un aclaramiento total del tumor, mientras otros individuos presentaban una respuesta parcial (TGI transitoria) y algunos individuos no fueron respondedores. También se mostró un efecto in vivo del tratamiento de combinación de anti-mPVRIg y anti-mPDL-1 en los modelos tumorales MC38 y B16-D^b/gp100 (datos no mostrados).

Están planeados estudios in vivo adicionales para evaluar las dependencias de la dosis y la eficacia en modelos singénicos adicionales o en combinación con compuestos o regímenes de tratamiento adicionales.

J. Ejemplo 10: descubrimiento de anticuerpos terapéuticos frente a TIGIT por exposición en fago

1. Introducción

Se llevó a cabo una campaña de descubrimiento de anticuerpos por exposición en fagos para aislar agentes de unión a TIGIT humano a partir de una biblioteca de fab humanos sin estimular usando el dominio extracelular de TIGIT humano recombinante como antígeno diana. Se aislaron cuarenta y cinco nuevos anticuerpos específicos de TIGIT humano y se generaron como IgG4 humana, incluyendo una S241P opcional en la región bisagra como se discute en la presente memoria. Los anticuerpos resultantes se cribaron para determinar su capacidad de bloquear la interacción TIGIT-PVR y para determinar la reactividad cruzada con el TIGIT de cynomolgus expresado en células por citometría de flujo. Dos de estos anticuerpos se optimizaron adicionalmente para una mayor afinidad de unión a TIGIT humano y de cynomolgus.

2. Protocolos

Antígenos para el descubrimiento de anticuerpos por exposición en fagos: se usaron dos formatos de proteína TIGIT humana como antígenos en la exposición en fagos. El primero comprendía el ECD de TIGIT humano (Met22-Pro 141) fusionado con una etiqueta de polihistidina C-terminal (hTIGIT-HIS) y bien se generó internamente o se obtuvo de fuentes comerciales de Sino Biological Inc. El segundo formato de antígeno comprendía el ECD de TIGIT humano fusionado con un dominio Fc de IgG1 humana en el extremo C (hTIGIT-hFc) y bien se generó internamente o se obtuvo de fuentes comerciales de R&D Systems.

QC funcional de los antígenos: los antígenos TIGIT recombinantes usados para ciclos de selección se validaron funcionalmente por su capacidad de unirse a PVR humano, el ligado de TIGIT humano. Los antígenos biotinilados se

ensayaron para determinar la unión a PVR, bien por ELISA o citometría de flujo. El hTIGIT-HIS biotinilado se validó por su capacidad de unirse a hPVR-hFc (Sino Biological Inc.) por ELISA. El hTIGIT-hFc biotinilado se validó por citometría de flujo por su capacidad de unirse a PVR expresado de forma endógena en la superficie en células Expi293.

Reconocimiento y selección de fagos de la biblioteca de anticuerpos humanos: se ejecutaron dos campañas de fagos, utilizando bien TIGIT humano-HIS (campaña 1) o TIGIT humano-hFc (campaña 2) como antígenos. Las reacciones de reconocimiento y selección se llevaron a cabo en disolución, usando lechos magnéticos recubiertos con estreptavidina para exponer los antígenos TIGIT biotinilados. Ambas campañas usaron una biblioteca de exposición en fago de anticuerpo fab humano para el descubrimiento inicial. Se llevaron a cabo tres rondas de reconocimiento y selección usando los antígenos TIGIT humano respectivos, con una mayor astringencia en el lavado y menores concentraciones de antígeno en cada ronda sucesiva de reconocimiento y selección. El anticuerpo CPA.9.002, generado en la campaña 1, se optimizó para una unión mejorada a TIGIT humano generando una biblioteca de fagos por mutagénesis de saturación de L-CDR3 y reconocimiento y selección de la biblioteca resultante frente a TIGIT humano-HIS (campaña 3). Dos anticuerpos, CPA.9.059 y CPA.9.027, generados en las campañas 2 y 3, respectivamente, también se optimizaron para una afinidad mejorada para TIGIT humano y reactividad cruzada con TIGIT de cyno (campaña 4). Para cada anticuerpo, se generó una biblioteca de fagos por mutagénesis de saturación de dos CDR (cualquier combinación de H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, o L-CDR3). Las bibliotecas de fagos resultantes se sometieron a reconocimiento y selección durante cuatro rondas frente a TIGIT humano-HIS y proteína recombinante de ECD de TIGIT de cyno etiquetada en C-terminal con HIS en rondas alternantes de reconocimiento y selección. Los antígenos de reconocimiento y selección usados fueron los siguientes: TIGIT humano-HIS 1 nM en la ronda 1, TIGIT de cyno-HIS 1 nM en la ronda 2, TIGIT humano-HIS 0,1 nM en la ronda 3, y TIGIT de cyno-HIS 0,1 nM en la ronda 4.

Cribados de unión usando anticuerpos expresados como fragmentos fab: la construcción de fagémido contiene un codón de parada ámbar que le permite funcionar como un vector de expresión de fab. La transformación de estos vectores en E. coli y la inducción con β-D-1-tiogalactopiranósido de isopropilo (IPTG) da lugar a la expresión periplásmica de moléculas fab solubles. Las proteínas fab secretadas en el periplasma de E. coli se extrajeron por choque osmótico para los cribados de unión.

Cribado primario por ELISA: los extractos fab PPE se ensayaron para determinar la unión al antígeno de reconocimiento y selección hTIGIT-HIS o hTIGIT-hFc por ELISA. Los aciertos positivos del cribado de ELISA se secuenciaron usando cebadores específicos de la cadena pesada y cadena ligera. Las secuencias se ensamblaron y se analizaron. Los clones se consideraron con secuencia única, si había más de una diferencia no conservativa en la CDR3 de la cadena pesada.

Cribado secundario por citometría de flujo: los clones de fab positivos en ELISA como secuencia única se seleccionaron y se analizaron para determinar su capacidad de unirse a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano por citometría de flujo. Se usaron células parentales Expi293 como un control negativo para cada muestra de fab.

Reformateo de los aciertos de fab y producción como moléculas de IgG4 humanas: los fab de unión a TIGIT humano potenciales se convirtieron en IgG4 humana de longitud completa (incluyendo un mutante S241P en la bisagra, véase, Aalberse et al., Immunology 202 105:9-19, incorporado por el presente por referencia en su totalidad, y, en particular, para la discusión de S241P y referencias 1, 2 y 3 citadas en el documento) para una caracterización adicional. Las construcciones de expresión de la proteína se obtuvieron por amplificación por PCR de las secuencias de la cadena pesada y ligera variable, que se subclonaron en el vector pUNO3 (Invivogen).

3. Resultados

QC funcional de las proteínas recombinantes TIGIT humanas: las proteínas recombinantes hTIGIT-HIS y hTIGIT-hFc, generadas bien internamente o de fuentes comerciales, se validaron funcionalmente por su capacidad de unirse a PVR humano. PVR humano (conjugado con Fc) mostró una unión dependiente de la dosis a hTIGIT-HIS biotinilado en ELISA (datos no mostrados). Se observó una unión similar en la orientación inversa cuando PVR se inmovilizó en la placa de ELISA y hTIGIT-HIS estaba en disolución (datos no mostrados).

La proteína hTIGIT-hFc se validó funcionalmente por unión a PVR en un ensayo de citometría de flujo. En este ensayo, la proteína hTIGIT-hFc se tituló frente a las células Expi293 que expresan de forma endógena PVR humano. La interacción se detectó usando un anticuerpo secundario anti-hFc conjugado con el marcador de fluorescencia AF647. Se usó una proteína Fc irrelevante como un control (datos no mostrados).

Se hicieron ensayos funcionales en varios de los candidatos como se describe en los Ejemplos más adelante.

Cribados de unión de maduración por afinidad usando anticuerpos expresados como fragmentos fab: se analizaron ocho placas de 96 pocillos de clones de fab periplásmicos extraídos para las campañas de novo (1 y 2). Se identificaron setenta y tres clones únicos en la campaña 1 usando la proteína hTIGIT-HIS como antígeno diana. El cribado secundario de los 73 clones positivos en ELISA por citometría de flujo identificó 21 positivos para la unión a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano. Un cribado similar para la campaña 2 (hTIGIT-hFc como antígeno diana)

rindió 37 clones positivos en ELISA, 24 de los cuales también fueron positivos para la unión a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano, por citometría de flujo (Figura 52).

Dos de las placas de 96 pocillos de clones de fab (como PPE) se cribaron para las campañas de optimización/maduración por afinidad (3 y 4). Las variantes únicas positivas en ELISA se cribaron para la unión a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano y/o de cynomolgus en citometría de flujo. Las afinidades de unión de los mejores clones a la proteína hTIGIT-HIS también se evaluó por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). El primer ciclo de maduración por afinidad del anticuerpo CPA.9.002 rindió 5 nuevos anticuerpos, CPA.9.021, CPA.9.027, CPA.9.044, CPA.9.048, y CPA.9.049, con mutaciones en la L-CDR3 y una mejora de al menos 3 veces en la afinidad de unión para TIGIT humano recombinante. Un segundo ciclo de optimización del anticuerpo CPA.9.027 rindió 4 nuevos anticuerpos con una mejora de al menos 25 veces en la unión a TIGIT humano recombinante. Las nuevas variantes mostraron mutaciones en la H-CDR2 y L-CDR3 (CPA.9.083 y CPA.9.086) y adicionalmente en la L-FR4 para CPA.9.089 y CPA.9.093. La optimización de CPA.9.059 dio lugar a dos nuevos anticuerpos, CPA.9.101 y CPA.9.103, con una unión significativamente mejorada a TIGIT de cynomolgus, así como una mejora significativa en la unión a TIGIT humano para CPA.9.103. Las mutaciones se observaron en H-CDR3 y L-CDR1 para las dos nuevas variantes. Adicionalmente, se observaron cambios menores en L-FR1 para CPA.9.101.

Reformateo de los fab positivos en ELISA y FACS en hIgG4: se reformatearon cuarenta y cinco fab únicos positivos en ELISA y citometría de flujo para la unión a TIGIT humano para la expresión como moléculas de IgG4 humanas, incluyendo una variante de bisagra S241P opcional como se discute en la presente memoria. Además, también se reformatearon 11 variantes con afinidad optimizada como IgG4. Las secuencias de anticuerpos derivados de fago seleccionados se muestran en la Figura 53. Las secuencias de dos anticuerpos de referencia, BM26 (WO2016/028656, Clon 31C6) y BM29 (US2016/0176963, Clon 22G2) también se muestran en la Figura 53 para comparación. Los anticuerpos reformateados se evaluaron para determinar su unión a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano y se generó una curva de unión para calcular la constante de unión en equilibrio (KD). Estos anticuerpos también se evaluaron para determinar la unión a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT de cyno, así como su capacidad de bloquear la interacción entre TIGIT humano y PVR humano en ensayos basados en células. Sobre la base de esta caracterización, se seleccionó un subconjunto de estos anticuerpos para los ensayos funcionales in vitro como se describe más completamente más adelante.

K. Ejemplo 11: descubrimiento de anticuerpos terapéuticos frente a TIGIT por hibridoma

1. Base racional y objetivos

Se usó la tecnología del hibridoma usando métodos conocidos y estándar en el campo para generar anticuerpos murinos que se unen a TIGIT humano con alta afinidad, reaccionan de manera cruzada con TIGIT de primates no humanos (macaco cynomolgus, Macaca fascicularis, referido como cyno), y bloquean la interacción de TIGIT con su ligando, PVR (CD155).

2. Resumen

Se inmunizaron ratones Balb/c con formas recombinantes de proteínas del dominio extracelular de TIGIT humano y de cyno. Las células aisladas el bazo y nódulos linfáticos de los ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular de mieloma Sp2/0 para generar hibridomas que secretan anticuerpos murinos. Los sobrenadantes de los hibridomas policlonales y monoclonales subclonados se cribaron por la unión a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano y de cyno y por la afinidad de unión a proteínas recombinantes TIGIT humana y de cyno usando métodos estándar de SPR. Los anticuerpos murinos de hibridomas seleccionados se purificaron y se caracterizaron extensamente en ensayos de unión y funcionales. Cinco anticuerpos murinos funcionales y con reacción cruzada con cyno se humanizaron para contener un marco (incluyendo una variante de bisagra opcional como se indica en la presente memoria) e isotipo hIgG4. Las secuencias se muestran en la Figura 53.

L. Ejemplo 12: mediciones de KD por FACS de la unión de anticuerpos derivados de fago e hibridoma a células que sobreexpresan TIGIT humano y de cyno

1. Protocolos

Se prepararon las siguientes líneas celulares para estimar las afinidades de unión de los anticuerpos anti-TIGIT de fago humano y de ratón: Expi293 Parentales, Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano, y Expi293 que sobreexpresan TIGIT de cyno. Los siguientes anticuerpos de hibridoma y fago se prepararon cada uno en una serie de dilución seriada de 2 veces de 11 puntos en un rango de concentración en el sitio de unión de 195pM-200nM:

Anticuerpos generados por fagos: CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059.

Anticuerpos generados por hibridoma (pre-humanización): CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.543, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560. Se incluyeron dos anticuerpos de referencia diferentes, BM26 (WO2016/028656A1, Clon 31C6 como IgG1 de ratón) y BM29 (US2016/0176963 A1, Clon 22G2 como IgG1 de ratón).

El 12º pocillo de cada titulación contenía solo tampón para funcionar como fondo. Cada tipo celular se incubó con un mAb anti-TIGIT humano durante 60 minutos a 4 °C. Después de lavar, se añadieron anti-F(ab') humano de cabra etiquetado con AF647 (Jackson Immunoresearch) y anti-IgG-Fc de ratón de cabra etiquetado con AF647 (Southern Biotech #1030-30) a las células incubadas con los mAb humanos y de ratón, respectivamente. Un instrumento FACS Canto II HTS registró entonces la Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (gMFI) de 5.000-10.000 eventos para cada pocillo. Se ajustó una representación de la gMFI como una función de la concentración molecular de PVR humano usando el modelo de Graphpad Prism "un sitio, unión específica" para estimar la KD y los intervalos de confianza al 95 % de cada ajuste no lineal.

2. Resultados

Las dos KD de FACS independientes medidas para cada mAb se diferenciaron no más de 2 veces de promedio. Una única medición representativa para KD junto con el intervalo de confianza al 95 % del ajuste de la isoterma de unión se lista para cada mAb para células que sobreexpresan humano y cyno en la Figura 54 y Figura 55, respectivamente. CPA.9.059 no mostró unión a células que sobreexpresan cyno. Debe indicarse que las concentraciones del sitio de unión (2X la concentración molecular) para todos los mAb se usan para el ajuste de la curva no lineal, lo que significa que se hace la asunción de que este método de KD FACS está midiendo la constante del sitio de unión (kD) en lugar de la constante de unión molecular o estequiométrica.

M. Ejemplo 13: ensayo de bloqueo por FACS de mAb anti-TIGIT humano derivado de fago e hibridoma que inhiben la unión de PVR-Fc a TIGIT

1. Introducción

El propósito de este ensayo es caracterizar la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de fago e hibridoma de inhibir la unión de PVR humano a TIGIT humano sobreexpresado en una superficie celular. En primer lugar, se determinará la afinidad de unión de TIGIT humano-PVR humano por FACS. Las isotermas de unión mostraron la concentración saturante de PVR humano que se usó para los ensayos de bloqueo. A continuación, las células que sobreexpresan TIGIT humano se titularon con mAb anti-TIGIT producidos en fago e hibridoma, seguido de la adición de una concentración saturante de PVR humano. Se midió entonces usando FACS la unión del anticuerpo anti-TIGIT humano en las células con sobreexpresión.

2. Protocolos

Ensayo de KD por FACS: se ensayaron varios isotipos de PVR humano-Fc a través de FACS para determinar la unión óptima y se determinó que PVR humano-h1Fc (Sino Biological #10109-H20H) y PVR humano-m2aFc (Compugen) mostraban los mayores niveles de unión a células que sobreexpresan TIGIT humano. Los dos isotipos de PVR se diluyeron cada uno de forma seriada 2 veces en una serie de titulación de 11 puntos a un rango de concentración molecular final de 98pM-100nM. El 12º pocillo de cada titulación contenía solo tampón para funcionar como fondo. Cada tipo celular se incubó con mAb durante 60 minutos a 4 °C. Después de lavar, se añadieron fragmento F(ab')2 de cabra etiquetado con AF647 anti-Fc humano (Jackson Immunoresearch #109-606-098) y anti-IgG de ratón de cabra etiquetado con AF647 (SouthernBiotech #1033-31) a los pocillos titulados con los mAb anti-TIGIT humano y de ratón, respectivamente. Un instrumento FACS Canto II HTS registró entonces la Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (gMFI) de 5.000-10.000 eventos para cada pocillo. Se ajustó una representación de la gMFI como una función de la concentración molecular de PVR humano usando el modelo de Graphpad Prism "un sitio, unión específica" para estimar la KD y los intervalos de confianza al 95 % de cada ajuste no lineal. Los resultados de PVR humano-m2aFc y PVR humano-h1Fc se muestran en la Figura 57A y B, respectivamente.

Ensayo de bloqueo con mAb de fago: los siguientes anticuerpos hIgG4 derivados de fago y mAb de referencia se prepararon cada uno en una serie de dilución seriada de 5 veces de tres puntos a un rango de concentración en el sitio de unión de 267pM-6,7 nM: CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059, así como BM26 (WO2016/028656A1, Clon 31C6 como hIgG4) y Synagis hIgG4 (control de isotipo negativo).

El 4º pocillo de cada titulación contenía solo tampón para funcionar como fondo. Las células se incubaron con mAb durante 15 minutos a 4 °C. Se incubó entonces PVR humano-m2aFc (Compugen) durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar, se añadió anti-IgG de ratón de cabra etiquetado con AF647 (SouthernBiotech #1033-31). Un instrumento FACS Canto II HTS registró entonces la Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (gMFI) de 5.000-10.000 eventos para cada pocillo. Los valores de gMFI de PVR humano unido para las células preincubadas con los mAb se compararon con los valores de gMFI de las células preincubadas con el mAb de referencia bloqueante y mAb control no bloqueante. Si el anticuerpo de fago reducía la señal de unión de PVR humano-m2aFc en comparación con la señal de la titulación con el mAb no bloqueante conocido, el anticuerpo se caracterizó como que bloqueaba la unión de PVR a esa concentración del mAb de fago. Las tendencias del bloqueo de los mAb de fago fueron similares al bloqueo de PVR con el BM26 de referencia (Figura 58).

Ensayo de bloqueo con mAb de hibridoma: los siguientes anticuerpos de hibridoma se prepararon cada uno en una serie de dilución de 2,5 veces de 11 puntos a un rango de concentración en el sitio de unión de 14pM-133nM: CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26 (WO2016/028656A1, Clon 31C6 como IgG1 de ratón) y BM29 (US2016/0176963A1, Clon 22G2 como IgG1 de ratón).

El 12º pocillo de cada titulación contenía solo tampón para funcionar como fondo. Las células se incubaron con mAb durante 15 minutos a 4 °C. Se añadió entonces PVR humano-h1Fc (Sino Biological #10109-H20H), y las células se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar, se añadió fragmento F(ab')2 anti-Fc humano de cabra etiquetado con AF647 (Jackson Immunoresearch). Un instrumento FACS Canto II HTS registró entonces la Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (gMFI) de 5.000-10.000 eventos para cada pocillo. Se ajustó una representación de la gMFI como una función de la concentración en el sitio de unión de mAb de forma no lineal usando el modelo de Graphpad Prism "log(inhibidor) frente a respuesta-Pendiente variable (cuatro parámetros)" para estimar la CI50 de cada ajuste no lineal. Este experimento se repitió dos veces durante dos días.

3. Resultados

Las Figuras 58 y 59 demuestran que tanto los anticuerpos de fago como de hibridoma bloquean potentemente la unión de PVR humano-Fc a TIGIT humano sobreexpresado en la superficie celular de las células Expi293. La actividad bloqueante de los anticuerpos de fago e hibridoma es comparable con los dos anticuerpos de referencia ensayados, BM26 y BM29.

N. Ejemplo 14: estudios de cinética por resonancia de plasmón superficial (SPR) de la unión de nueve mAb derivados de fago e hibridoma a TIGIT humano, de cyno, y de ratón

1. Protocolos

Todos los experimentos se realizaron usando un instrumento ProteOn XPR 36 a 22 °C. En primer lugar, se prepararon superficies de captura de alta densidad con anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humano (Thermo #H10500) y anticuerpos de conejo anti-ratón (GE Healthcare #BR100838), respectivamente, inmovilizados sobre los carriles de captura verticales y puntos intermedios horizontales en chips de GLC separados usando acoplamiento de amina estándar. Los niveles típicos de inmovilización para el pAb de captura anti-humano y el anticuerpo de captura anti-ratón para cada chip de GLC fueron alrededor de 5.000RU. El TIGIT humano se obtuvo de Sino Biologicals, mientras el monómero de TIGIT de ratón y monómero de TIGIT de cyno se prepararon internamente. Los mAb purificados estudiados para determinar la unión a TIGIT humano, de ratón, y de cyno se listan a continuación:

Anticuerpos de fago: CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059

Anticuerpos de hibridoma: CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.543, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560

Comparaciones de referencia: BM26 (WO2016/028656A1, Clon 31C6 como hIgG4) y BM29 (US2016/0176963A1, Clon 22G2 como hIgG4).

Cada mAb se diluyó hasta ~0,5 µg/mL en tampón de operación que era 1xPBST con BSA filtrada añadida a una concentración final de 100 µg/mL. Para cada ciclo de "cinética de una toma " en el instrumento ProteOn, se capturó un mAb diferente sobre uno de los seis únicos carriles de captura verticales durante aproximadamente 1,5-2,5 minutos. Después de cambiar el flujo del tampón del ProteOn a la dirección horizontal, las superficies de captura se estabilizaron durante aproximadamente 15-20 minutos. Se inyectaron seis concentraciones de una serie de dilución de 3 veces de TIGIT humano (346pM-84,1nM), TIGIT de cyno (371pM-90,2nM), o TIGIT de ratón (382pM - 92,9nM) durante 2 minutos seguido de 20 minutos de disociación a una velocidad de flujo de 50µL/min. Una inyección de tampón idéntica precedió cada serie de antígeno inyectado para una doble referencia. Las superficies de anticuerpo anti-humano se regeneraron con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 146mM y las superficies de captura de anticuerpo anti-ratón se regeneraron con dos pulsos de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 1,7. Los sensorgramas del antígeno TIGIT inyectado sobre mAb capturados se procesaron usando una versión ProteOn de Scrubber y se ajustaron a un modelo de unión cinética 1:1 incluyendo un término para transporte de masa.

La Figura 56 muestra las constantes de velocidad cinética resultantes y las constantes de disociación en equilibrio, donde los datos fueron lo suficientemente fiables como para estimar las constantes de unión (datos de los sensogramas no mostrados). Los asteriscos indican los valores de kd que tenían que mantenerse constantes a 1,00x10-5 /seg. En casos tales como la unión del clon CHA.9.560 a TIGIT humano, el modelo cinético fue capaz de estimar una Kd, pero es virtualmente imposible estimar de forma exacta una Kd en el orden de $1x10^{-6}$/seg después de solo 20 minutos de datos de disociación, dada la sensibilidad de la instrumentación.

O. Ejemplo 15: análisis funcionales de los anticuerpos anti-TIGIT

1. Base racional y objetivos

Para caracterizar funcionalmente la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano de inhibir la interacción de TIGIT y su ligando PVR, y para aumentar consecuentemente la activación de las células T humanas bien como una monoterapia o en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG humano, CHA.7.518.1.H4(S241P).

2. Protocolos

Ensayo informador de luciferasa de TIGIT humano/CD155 Jurkat IL-2: el kit de bioensayo de informador de luciferasa de TIGIT/PVR humano Jurkat IL-2 (Promega) se utilizó para evaluar el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-

TIGIT humano en la activación de las células T. Las células T Jurkat se transfectaron de forma estable con TIGIT humano recombinante y un gen informador de luciferasa dirigido por el elemento de respuesta de IL-2 (IL-2-RE). Las células estimuladoras fueron células CHO-K1 APC artificiales (aAPC) que expresan PVR humano recombinante, y una proteína de superficie celular preparada por ingeniería diseñada para activar la señalización mediada por TCR de una manera independiente de antígeno. Después del cocultivo de estas células, la interacción TIGIT humano/PVR humano inhibe la señalización de TCR y la luminiscencia mediada por IL-2-RE. La adición de un anticuerpo anti-TIGIT humano que bloquea la interacción TIGIT humano/PVR humano libera la señal inhibidora, lo que da lugar a la activación de las células T y a la luminiscencia mediada por IL-2-RE. El ensayo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células CHO-K1 aAPC con PVR humano se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se diluyeron en medio F-12 suplementado con FBS al 10 % (Promega). Se sembraron 25.000 células/pocillo en placas blancas tratadas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo (Costar). Las placas se incubaron entonces toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se añadieron anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y de fago, IgG1 de ratón (mIgG1) y control de isotipo hIgG4, o anticuerpos de referencia (BM) anti-TIGIT humano bien como una única dosis a 10 µg/ml, o en una serie de dilución de 2 veces de 10 puntos, empezando en 20 µg/ml. Las células Jurkat IL-2-RE luciferasa TIGIT humano se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se diluyeron en medio RPMI suplementado con FBS al 10 % (Promega). Se añadieron 125.000 células Jurkat a cada pocillo. Las placas se incubaron entonces a 37 °C con CO2 al 5% durante 6 horas. Después de la incubación, las placas se retiraron del incubador y se dejó que se equilibraran a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 80 µL de sustrato de luciferasa Bio-Glo (Promega) a cada pocillo y se dejó que la mezcla se equilibrara durante 10 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. La luminiscencia se cuantificó en un lector de múltiple marcaje En Vision (Perkin Elmer) con un detector de luminiscencia ultrasensible. La señal de luminiscencia se reportó en unidades de luz relativas (RLU).

Expansión de células T $CD8^+$ humanas específicas de CMV: se descongelaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas reactivas con CMV (CTL), se resuspendieron a $2x10^6$ células/ml, y se estimularon con 1 µg/ml del péptido de CMV pp65 (Anaspec) en medio completo RPMI suplementado con 2 ng/ml de IL-2 humana recombinante (R&D systems) y 10 ng/ml de IL-7 humana recombinante (R&D systems) a 37 °C con. Después de 9 días, las células se dividieron 1:2 y se dejaron con una dosis baja de IL-2 humana (100 UI/ml). La frecuencia de células T $CD8^+$ específicas de CMV se determinó con el tetrámero de CMV pp65/HLA-A2 (MBL). Las células T $CD8^+$ específicas de CMV que fueron un 65-98 % positivas para el tetrámero se utilizaron en ensayos entre los días 12 y 16 después de la estimulación con el péptido de CMV.

Ensayo de cocultivo de células T $CD8^+$ humanas específicas de CMV con líneas celulares de melanoma que expresan PVR humano: se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con células T CD8+ humanas específicas de CMV para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT humano en la secreción de citoquinas específica de antígeno. La línea celular diana usada en el ensayo fue la línea celular de melanoma HLA-$A2^+$, Mel624 transducida de forma estable con un lentivirus que contenía ADN de PVR humano (System Biosciences). Se pulsó un conjunto estable de células Mel624 que sobreexpresan PVR humano con el péptido de CMV pp65 a 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron entonces y se sembraron en placas a 50.000 células/pocillo. Se añadieron anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago, anticuerpos de control de isotipo mIgG1 o hIgG4, o anticuerpos BM anti-TIGIT humano a una concentración de 10 µg/ml. Las células T CD8+ humanas específicas de CMV de tres donantes diferentes, especificados como Donante 2, Donante 4, y Donante 210 se expandieron según el protocolo anterior. Se añadieron 50.000 células T $CD8^+$ humanas a cada pocillo. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con CO2 al 5 % durante 24 horas. Después de la incubación, las placas se centrifugaron a 1.200 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante. La cantidad de interferón gamma (IFNγ) humano en el sobrenadante del cocultivo se midió por citometría de flujo usando un ensayo citométrico de lechos (BD).

Ensayo de cocultivo de células T $CD8^+$ humanas específicas de CMV con líneas celulares de melanoma que expresan PVR humano y PVRL2 (CD112) humano: se evaluó el efecto combinado de anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P), un anticuerpo anti-PVRIG humano, en la secreción de citoquinas específica de antígeno por un ensayo de cocultivo in vitro con células T CD8+ humanas específicas de CMV similar al ensayo descrito anteriormente. La línea celular diana usada en el ensayo fue la línea celular de melanoma HLA-$A2^+$, Mel624, que expresa de forma estable PVR humano y PVRL2 humano, los ligandos para TIGIT y PVRIG, respectivamente, a través de la transducción lentiviral (System Biosciences). Las células Mel624 que sobreexpresan PVR humano y PVRL2 humano se pulsaron con el péptido de CMV pp65 a 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron entonces y se sembraron en placas a 50.000 células/pocillo. Se añadieron anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago, o un anticuerpo BM anti-TIGIT humano, al cultivo en combinación con CHA.7.518.1.H4(S241P) o un anticuerpo de control de isotipo hIgG4 a 10 µg/ml. Las células T CD8+ humanas específicas de CMV de tres donantes diferentes, especificados como Donante 4, Donante 25, y Donante 210 se expandieron, según el protocolo anterior. Se añadieron 50.000 células T $CD8^+$ humanas a cada pocillo. Los cocultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, las placas se centrifugaron a 1.200 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante. La cantidad de interferón gamma (IFNγ) humano en el sobrenadante del cocultivo se midió por citometría de flujo usando un ensayo citométrico de lechos (BD).

3. Resultados

Los anticuerpos anti-TIGIT humano aumentan la señalización de IL-2: la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago para aumentar la señalización de IL-2 se evaluó con el ensayo de informador luciferasa TIGIT humano/PVR humano en Jurkat. La Figura 60 y la Figura 62 demuestran el efecto de 10 µg/ml de anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de fago o hibridoma en la señalización de IL-2, respectivamente. Tres anticuerpos derivados de fagos, CPA.9.027, CPA.9.049, y CPA.9.059 aumentaron de forma robusta la señalización de IL-2 en comparación con el control de isotipo hIgG4. Además, los tres anticuerpos de fago indujeron más señalización de IL-2 en comparación con los anticuerpos BM anti-TIGIT humano, BM26 y BM29. Los cinco anticuerpos derivados de hibridoma, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560 también indujeron la señalización de IL-2 en comparación con el control de isotipo mIgG1. Se debe indicar que los cinco anticuerpos de hibridoma indujeron una señalización de IL-2 similar en comparación con BM26 y BM29. El anticuerpo anti-TIGIT humano no bloqueante, CHA.9.543, no incrementó significativamente la señalización de IL-2. Para determinar si el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT era dependiente de la dosis, el ensayo se llevó a cabo con una serie de dilución de 2 veces de 10 puntos para cada anticuerpo empezando en 20 µg/ml (Figuras 61 y 63). La señalización de IL-2 disminuyó de una forma dependiente de la dosis con los ocho anticuerpos anti-TIGIT humano, así como con BM26 y BM29.

Los anticuerpos anti-TIGIT humano incrementan la secreción de IFNγ de células T CD8+ humanas específicas de CMV: la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago para modular la secreción de IFNγ se evaluó con el ensayo de cocultivo de células T específicas de CMV/Mel624. La Figura 64 muestra el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT humano en la secreción de IFNγ. Tres anticuerpos derivados de fagos, CPA.9.027, CPA.9.049, y CPA.9.059 aumentaron la secreción de IFNγ en comparación con el medio solo y el anticuerpo de control de isotipo hIgG4. Adicionalmente, cinco anticuerpos derivados de hibridoma, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560 también incrementaron la producción de IFNγ en comparación con el anticuerpo de control de isotipo mIgG1. Los anticuerpos frente a TIGIT derivados de fago e hibridoma indujeron IFNγ de una manera similar a BM26 y BM29. Como se esperaba, el anticuerpo anti-TIGIT humano no bloqueante, CHA.9.543, no afectó significativamente la secreción de IFNγ.

La Figura 65 muestra el efecto combinado de los anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P) en la secreción de IFNγ. Tres anticuerpos derivados de fagos, CPA.9.027, CPA.9.049, y CPA.9.059, y cinco anticuerpos derivados de hibridoma, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560, incluyendo BM26, todos aumentaron la secreción de IFNγ en comparación con sus anticuerpos de control de isotipo respectivos, cuando se trataron solos, o en combinación con CHA.7.518.1.H4(S241P). El anticuerpo anti-TIGIT humano no bloqueante, CHA.9.543, dio lugar a una menor secreción de IFNγ en comparación con otros anticuerpos anti-TIGIT humano. El porcentaje de incremento de la secreción de IFNγ en cada anticuerpo sobe los anticuerpos de control de isotipo respectivos se resume en la Figura 66. Se observa un efecto sinérgico en el tratamiento combinado de los anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P).

4. Resumen y conclusiones

La adición de anticuerpos anti-TIGIT humano al ensayo de informador TIGIT humano/PVR humano en Jurkat indujo un incremento robusto dependiente de la dosis en la señalización de IL-2. Adicionalmente, los anticuerpos anti-TIGIT humano incrementaron la secreción de IFNγ de células T CD8+ humanas específicas de CMV cuando se cocultivaron con células Mel624 con PVR humano. La secreción de IFNγ se incrementó adicionalmente por anticuerpos anti-TIGIT humano en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG humano. Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que los anticuerpos anti-TIGIT humano pueden bloquear la supresión mediada por TIGIT de la activación de las células T humanas, y la activación de las células T humanas aumenta por el cobloqueo tanto de TIGIT como de PVRIG.

P. Ejemplo 16: análisis de preclasificación de anticuerpos anti-TIGIT

1. Protocolos

Los experimentos fueron realizados por Wasatch Microfluidics Inc. (Salt Lake City, UT) usando un Microdosificador de Flujo Continuo (CFM) y un Formador de Imágenes de SPR IBIS MX96 (MX96 SPRi). Los siguientes mAb anti-TIGIT humano y variantes de PVR humano-Fc se diluyeron cada uno hasta ~ 10µg/mL en acetato de sodio 10mM, pH 5,0 y se inmovilizaron covalentemente usando acoplamiento de amina estándar en puntos independientes de un chip de prisma biosensor Xantec 200M durante ciclos de 7 minutos usando el CFM:

1	CPA.9.009-H4	17 CPA.9.081-H4	32 CHA.9.555
2	CPA.9.011-H4	18 CHA.9.519	33 CHA.9.560
3	CPA.9.012-H4	19 CHA.9.521	34 CHA.9.525
4	CPA.9.013-H4	20 CHA.9.522	35 CHA.9.538
5	CPA.9.014-H4	21 CHA.9.527	36 CHA.9.543
6	CPA.9.015-H4	22 CHA.9.528	37 CHA.9.553

7	CPA.9.018-H4	23 CHA.9.529	38 CHA.9.556
8	CPA.9.027-H4	24 CHA.9.535	39 CHA.9.561
9	CPA.9.049-H4	25 CHA.9.536	40 BM8-H4
10	CPA.9.053-H4	26 CHA.9.541	41 BM9-H4
11	CPA.9.057-H4	27 CHA.9.546	42 BM26-H4
12	CPA.9.059-H4	28 CHA.9.547	43 BM29-H4
13	CPA.9.064-H4	29 CHA.9.549	44 MBSA43-M1
14	CPA.9.069-H4	30 CHA.9.552	45 PVR-Fc M2A
15	CPA.9.071-H4	31 CHA.9.554	46 Sino PVR-Fc
16	CPA.9.077-H4		

BM8-H4 y BM9-H4 se refieren a (US2015/0216970A1, Clones 10A7 y 1F4 reformateados como hIgG4), respectivamente. MBSA43-M1 es una IgG1 de ratón anti-TIGIT humano de eBioscience. El chip de prisma se lavó entonces con 1X PBST durante 3 minutos y después se cargó directamente en el formador de imágenes SPRi MX96, donde el exceso de ésteres de NHS se neutralizó con una inyección de 5 minutos de etanolamina 1 M. Los experimentos preliminares incluyeron varios ciclos de inyección de TIGIT monomérico humano 100 nM (Sino Biologicals, No. de Cat. 10917-H08H) sobre todos los mAb inmovilizados durante cuatro minutos seguido de la regeneración con el fin de ensayar la actividad de unión de los anticuerpos y determinar mejor las condiciones de regeneración mediante la evaluación de la reproducibilidad de la unión de TIGIT. Estos experimentos preliminares mostraron que el mejor reactivo para regenerar de forma reproducible la mayor parte de los mAb inmovilizados era un pulso de 30 segundos de ácido fosfórico 1/500. El PVR inmovilizado, sin embargo, no retuvo la actividad y, por lo tanto, se generaron sus patrones de bloqueo y "preclasificaron" como analitos en disolución solo. En estos experimentos preliminares y los experimentos de preclasificación descritos más adelante, todas las muestras de proteínas se prepararon en el tampón de operación que fue HBST desgasificado. Se realizó un protocolo de preclasificación de epítopos en "sándwich", donde cada mAb y PVR se inyectó sobre TIGIT que había formado un complejo previamente con cada mAb inmovilizado para determinar si el mAb inmovilizado bloquea o no al mAb en disolución evitando la unión a TIGIT. Para cada ciclo, se inyectó en primer lugar 100 nM de TIGIT sobre los mAb inmovilizados durante 4 minutos seguido inmediatamente de una inyección de 4 minutos de un mAb competidor o ligando a 274nM (concentración del sitio de unión). Esto se repitió con cada mAb y PVR actuando como el analito competidor. Los ciclos control con tampón de operación em lugar de proteína competidora se realizaron después de cada 12 ciclos para una doble referencia. Todas las superficies se regeneraron después de cada ciclo con un pulso de 30 segundos de ácido fosfórico 1/500. Los datos de los sensorgramas se procesaron y se referenciaron usando el software patentado de Wasatch. Una pareja de anticuerpos se clasificó como que tiene un epítopo de unión a TIGIT compartido si no se observó unión de la inyección del competidor sobre el TIGIT formando un complejo previo con el mAb inmovilizado. Una pareja de anticuerpos se clasificó como que se une a diferentes epítopos en TIGIT, o "en sándwich", si la inyección del mAb competidor mostró unión al TIGIT formando un complejo previo. La unión baja o mínima del competidor se clasificó como un bloqueante "intermedio". La agrupación jerárquica de los patrones de bloqueo de TIGIT por parejas para cada mAb y ligando se realizó usando el software patentado de Wasatch.

2. Resultados

Tanto las proteínas PVR-Fc como 13 de los mAb bien perdieron actividad o no pudieron regenerarse como ligandos, de manera que sus patrones de bloqueo se determinaron como analitos en disolución solo. El mAb CPA.9.014-H4 no se preclasificó porque no mostró unión a TIGIT. La Figura 67 muestra la agrupación de dendrograma sobre la base de los patrones de bloqueo por parejas para cada mAb y dos proteínas PVR. El eje vertical representa el factor de similitud estadística en los patrones de bloqueo. Wasatch Microfluidics aplicó un factor de corte de 5 para agrupar los mAb lo que se indica por la línea en la Figura 67. Para la definición más estricta de una "clase" de epítopo, donde solo aquellos mAb (y PVR) que muestran patrones de bloqueo idénticos se preclasifican conjuntamente, hay un total de 12 clases discretas. Si los patrones de bloqueo que muestran solo diferencias mínimas se agrupan conjuntamente, hay cuatro "comunidades" muy relacionadas de mAb y PVR. Estas "comunidades" se indican con diferentes bloques sombreados en la parte inferior de la Figura 67. La Figura 68 agrupa conjuntamente a los mAb y PVR que pueblan cada clase única discreta, con cada clase indicada por una caja negra. Las cajas grises rodean todas las clases únicas que componen cada "comunidad" de patrones de bloqueo relacionados. Los mAb y PVR en la Figura 68 se listan con la clave numérica que representa a cada proteína en el dendrograma en la Figura 67.

Q. Ejemplo 17: administración de anticuerpos anti-PVRIG para inactivar TIGIT en ratones

Base racional y objetivos

Examinar si la deleción de TIGIT en combinación con el bloqueo de PVRIG de ratón puede aumentar la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia en un modelo de tumor singénico en ratón.

Protocolos

Animales

Se generaron ratones con TIGIT inactivado (KO) en Ozgene Pty LTD (Australia). Los ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) (Ozgene) sirvieron como controles. Se usaron ratones TIGIT KO y C57BL/6 hembras de ocho a once semanas de edad. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal en la Universidad de Tel-Aviv (Tel-Aviv, Israel).

Modelos de tumor in vivo

Se inocularon subcutáneamente (s.c.) 1 x 105 células de melanoma B16/Db-hmgp100 en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT o TIGIT KO. El tratamiento con los anticuerpos se inició en el mismo día de la inoculación del tumor (día 0), con 7-10 ratones por grupo de tratamiento. Los anticuerpos usados fueron el control de isotipo de IgG1 de ratón (Clon MOPC-21 BioXcell), e IgG1 de ratón anti-PVRIG de ratón (Clon 407, Compugen LTD). Los anticuerpos se administraron a 10mg/kg por inyección intraperitoneal, dos veces por semana durante 3 semanas. El crecimiento tumoral se midió con un calibrador electrónico cada 2-3 días y se reportó como 0,5 X W2 X L mm3 (L es longitud y W es anchura del tumor). Los animales que alcanzaron un tamaño tumoral de 2.250mm3 se anestesiaron.

Análisis estadístico

Se realizó ANOVA de dos vías con mediciones repetidas, seguido de ANOVA de dos vías con mediciones repetidas para pares seleccionados de grupos usando software JUMP (Statistical Discoveries TM). Los análisis de las mediciones del crecimiento tumoral se realizaron comparando los volúmenes tumorales medidos en el último día en el que los animales del estudio estaban vivos. Las diferencias estadísticas en el porcentaje de ratones sin tumor se determinaron por el ensayo de rango logarítmico de Mantel-Cox. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Resultados

Inhibición del crecimiento tumoral in vivo después del tratamiento con anticuerpo bloqueante anti-PVRIG de ratón en ratones con TIGIT inactivado

Ensayamos la eficacia in vivo de la deleción de TIGIT en combinación con el bloqueo de PVRIG de ratón en un modelo de tumor de melanoma subcutáneo B16/Db-hmgp100 singénico en ratón. El tratamiento de ratones C57BL/6 WT que portaban tumor con un anticuerpo bloqueante anti-PVRIG de ratón tuvo un efecto menor en la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en comparación con el tratamiento de isotipo (17 % TGI en el día 11 y 8 % TGI en el punto final, día 18). El efecto de la deleción de TIGIT en el crecimiento tumoral fue menor en comparación con el grupo control C57BL/6 WT (17 % TGI en el día 11 y 13 % TGI en el punto final). Sin embargo, cuando la deleción de TIGIT se combinó con el tratamiento con el anticuerpo anti-PVRIG de ratón (Clon 407), fue evidente una TGI significativa (63 % en el día 11 y 49% TGI en el punto final) (Figura 80A y 80B). De acuerdo con TGI, los ratones TIGIT KO tratados con el anticuerpo anti-PVRIG de ratón (Clon 407) presentaron una supervivencia incrementada en comparación con el grupo control C57BL/6 WT, sin embargo, no se consiguió una significancia estadística (Figura 80C).

Resumen y conclusiones

La combinación de la deleción de TIGIT y el bloqueo de PVRIG redujo significativamente el crecimiento tumoral in vivo, indicando que tanto TIGIT como PVRIG juegan un papel inhibidor en este modelo de tumor de melanoma. Estos datos sugieren que la toma como diana tanto de TIGIT como de PVRIG podría ser otra terapia de combinación que aumenta significativamente las respuestas antitumorales.

R. Ejemplo 18: el antagonismo de PVRIG aumenta la función efectora de las células T y reduce el crecimiento tumoral

Resumen

A pesar de los avances recientes, la mayoría de los pacientes no obtienen un beneficio a largo plazo de los inhibidores de los puntos de control. PVRIG es un nuevo receptor inmuno supresor de la familia DNAM/TIGIT y hemos demostrado aquí un papel de PVRIG en la regulación de las respuestas antitumorales. PVRIG se une a PVRL2 y presenta una expresión significativamente aumentada en los linfocitos infiltrantes en tumores en comparación con los linfocitos de los tejidos normales. El antagonismo de PVRIG aumentó la activación de las células T humanas y la combinación de PVRIG bien con inhibidores de PD-1 o TIGIT incrementó adicionalmente de forma sinérgica la función de los linfocitos. A continuación, abordamos el papel de PVRIG en modelos tumorales preclínicos. Los ratones $PVRIG^{-/-}$ presentaron una activación de las células T in vitro significativamente incrementada y un crecimiento reducido de tumores MC38 que estuvo mediado por una función efectora CD8 incrementada. El anticuerpo antagonista anti-PVRIG redujo significativamente el crecimiento tumoral en combinación con anti-PD-L1 o cuando se ensayó en ratones $TIGIT^{-/-}$. En resumen, demostramos que la ruta PVRIG-PVRL2 estaba inducida en cánceres humanos y que el antagonismo de

las interacciones PVRIG-PVRL2 dio lugar a una función incrementada de las células T y a un crecimiento tumoral reducido.

Estado de significancia

Estos datos demuestran que PVRIG es una diana prometedora para el tratamiento del cáncer y proporcionan la base racional para ensayar un inhibidor de PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P), como un nuevo agente de inmunoterapia del cáncer bien como monoterapia o en combinación con el bloqueo de TIGIT o PD1.

Introducción

Una evidencia creciente demuestra que las respuestas inmunes endógenas son críticas para esculpir el inicio, progresión, y supresión del cáncer (1) (2). El estado inmune de los pacientes, así como el contenido de leucocitos infiltrantes de tumores (TIL) en el microentorno tumoral (TME), son indicadores de pronóstico clave no solo de las tasas de supervivencia del cáncer, sino también de cómo responden los pacientes a la terapia (3) (4). Las células T son un componente clave de los TIL que pueden provocar una respuesta antitumoral, y la mayor parte de las respuestas inmunes antitumorales se basan finalmente en la funcionalidad de las células linfocitos efectoras. Un enriquecimiento de células T CD8 en el TME del tumor de un paciente, así como otros factores que sesgan una respuesta inmune hacia una respuesta efectiva de células T CD8, tal como carga mutacional y un TME polarizado hacia Th1, son todos indicadores de pronóstico clave para una respuesta inmune antitumoral favorable (5) (6).

Una observación clave en muchos tumores sólidos es que las células T efectoras tienen un fenotipo activado o 'agotado' en el TME (7). Esto indica que, aunque las células T en el TME han visto inicialmente el antígeno cognado, han sido activadas, y transportadas al tumor, no son posteriormente capaces de provocar una respuesta antitumoral efectiva. Las células T preactivadas o agotadas se definen por la expresión incrementada en la superficie de receptores coinhibidores, tales como PD-1 y CTLA-4 (8). La toma como diana terapéutica de estos receptores coinhibidores con anticuerpos que inhiben las interacciones con sus ligandos cognados ha mostrado una eficacia clínica notable en pacientes con múltiples cánceres avanzados (9). Mecanísticamente, se ha mostrado que la toma como diana de estos receptores coinhibidores da lugar a la expansión de células T ya reactivas para el tumor que preexisten en el TME y a la producción de conjuntos de células T con una diversidad más amplia de receptores de células T (10) (11) (12). Aunque los inhibidores de los puntos de control actualmente en la clínica han revolucionado el tratamiento del cáncer y han demostrado el poder del sistema inmune para combatir el cáncer, muchos pacientes todavía recaen y/o no responden al tratamiento. Consecuentemente, la comprensión incrementada de la respuesta inmune en el cáncer y la toma como diana de rutas basadas en la inmunidad adicionales dará lugar a tratamientos terapéuticos adicionales.

Entre estas nuevas rutas, un grupo de receptores y ligandos en la familia de la nectina y semejante a la nectina se están investigando actualmente como nuevas inmunoterapias del cáncer. Los receptores en esta familia incluyen DNAM-1 (CD226), CD96 (TACTILE), TIGIT, y más recientemente, PVRIG (CD112R) (13) (14) (15). De estas moléculas, DNAM es un receptor activador en esta subfamilia, uniéndose a 2 ligandos, PVR (CD155) y PVRL2 (CD112), para suministrar una señal activadora a los linfocitos (16). Se ha mostrado que dos receptores en esta familia inhiben la función de los linfocitos humanos, TIGIT, y más recientemente, PVRIG (17) (18). Se reporta que TIGIT tiene una interacción de alta afinidad con PVR, una afinidad mucho más débil para PVRL2, y se ha mostrado que inhibe las respuestas tanto de las células T como de las células NK suministrando una señal inhibidora a los linfocitos a través de su resto ITSM (19) (20). Más recientemente, se mostró que PVRIG se une con alta afinidad a PVRL2 y que suministra una señal inhibidora a través de su resto ITIM (15). En ambos casos, la afinidad de TIGIT para PVR y de PVRIG para PVRL2 es mayor que la afinidad de DNAM para PVR o PVRL2, lo que sugiere que TIGIT y PVRIG pueden superar a DNAM respecto a PVR y PVRL2, proporcionando un mecanismo indirecto por el cual TIGIT y PVRIG pueden reducir la función de las células T. En esta familia, PVR también es un ligando para CD96. Se ha reportado que la función de CD96 es inhibidora en linfocitos de ratón (21) pero activadora en linfocitos humanos (22). Sobre la base de estos datos, postulamos en linfocitos humanos que 2 receptores, TIGIT y PVRIG, se unen con alta afinidad a PVR y PVRL2, respectivamente, para suministrar señales inhibidoras que disminuyen la función de las células T.

Aunque se ha mostrado que PVRIG humano inhibe la respuesta de las células T en un informe reciente, el papel de PVRIG y PVRL2 en la vigilancia inmune del cáncer no se entiende bien. En particular, no se ha reportado el perfil de expresión de esta ruta en los cánceres y el papel de PVRIG en la regulación de las respuestas antitumorales de las células T CD8. Además, no se ha reportado la caracterización funcional del gen de PVRIG de ratón y el efecto de la disrupción de la interacción PVRIG-PVRL2 in vivo en modelos tumorales preclínicos. En la presente memoria, elucidamos el papel de PVRIG en un entorno canceroso reportando el perfil de expresión de PVRIG y PVRL2 en el cáncer y el efecto del antagonismo de PVRIG en ensayos de cocultivo de células tumorales y en modelos tumorales preclínicos. Demostramos que PVRIG tiene un perfil de expresión diferenciado en subconjuntos de células T en comparación con TIGIT o CD96 y que la expresión de PVRIG y PVRL2 estaba inducida en el cáncer en comparación con los tejidos normales adyacentes. En múltiples sistemas de ensayo humanos in vitro, un anticuerpo monoclonal antagonista de PVRIG con alta afinidad (CHA.7.518.1.H4(S241P)) aumentó la función de las células T, en particular, cuando se combinó con anticuerpo anti-TIGIT o anti-PD1. Además, reportamos la nueva caracterización de PVRIG de ratón usando anticuerpos antagonistas o ratones deficientes en PVRIG y demostramos que la inhibición de la interacción PVRIG-PVRL2 reducía el crecimiento tumoral, con los efectos más potentes en combinación con la inhibición de PD-1 o la deficiencia genética de TIGIT. Colectivamente, estos datos muestran que PVRIG es un receptor

inhibidor crítico en la regulación de las respuestas antitumorales de las células T y apoyan el desarrollo de CHA.7.518.1.H4(S241P), para ensayo clínico en pacientes con cáncer.

Materiales y Métodos

Estudios de expresión en sangre periférica y tumores humanos

Se obtuvieron PBMC humanas de donantes sanos de la Universidad de Stanford según la Declaración de Helsinki. Los tejidos humanos fueron proporcionados por la Cooperative Human Tissue Network, un recurso financiado por el National Cancer Institute. El tejido canceroso humano y los tejidos normales adyacentes concordantes se disociaron en células únicas según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células disociadas se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de varias dianas en diferentes subconjuntos de células. Para la expresión de cada diana en un subconjunto de células individual, se calculó un valor de veces de expresión tomando el valor de MFI de la diana dividido por el valor de MFI del control de isotipo. Otros investigadores pueden haber recibido muestras de estos mismos especímenes de tejido. El tipo de tumor se determinó sobre la base de la revisión del informe de la patología para cada muestra. Para los estudios de IHC, se usaron el anticuerpo anti-PVRL2 (HPA-012759, Sigma) y PD-L1 (Sp142, SpringBio) para teñir micromatrices de tumor (Biochain institute) usando las condiciones como se describe en los métodos suplementarios. La puntuación se realizó por 2 revisores independientes en núcleos en duplicado del mismo tumor.

Generación y caracterización de los anticuerpos frente a PVRIG

Los anticuerpos anti-PVRIG humano y anti-PVRIG de ratón se generaron como se detalla en los métodos suplementarios. Brevemente, la especificidad y afinidad de unión de los anticuerpos se evaluaron por la unión selectiva a células preparadas por ingeniería con PVRIG sin unión detectable a células que no expresan el gen. La actividad antagonista de estos anticuerpos anti-PVRIG se determinó usando ensayos basados en ELISA y FACS en los que se disrumpió la interacción de PVRIG con PVRL2. Para la caracterización en ensayos basados en células, los anticuerpos se ensayaron en varios sistemas de ensayo de cocultivo de células T-célula diana, que consistieron en células diana que expresan PVRL2 en cultivo con PBMC o células T derivadas de tumor. Las líneas de células T específicas de gp100 se expandieron a partir de tumores de melanoma como se ha descrito previamente (23). Las células T reactivas para CMVpp65 se expandieron a partir de PBMC de donantes sanos (CTL immunospot) con CMVpp65 (495-503), IL-2, e IL-7 durante 10 días. Para los estudios de combinación, los anticuerpos frente a PD-1, TIGIT, y PVRIG se usaron a 10 µg/ml. Las concentraciones de citoquinas en el medio condicionado se determinaron usando Matriz de Lecho Citométrico (CBA) y la tinción de FACS se realizó como se describe en los métodos suplementarios.

Caracterización de la expresión y función de PVRIG de ratón

Las interacciones de unión de PVRIG de ratón con mPVRL2 y mPVR se evaluaron por SPR y ELISA usando proteínas recombinantes PVRIG, PVRL2, y PVR y por FACS usando líneas celulares preparadas por ingeniería que sobreexpresan ectópicamente PVRIG y PVRL2 o líneas celulares transfectadas con ARNsi de PVR o PVRL2. Los ratones deficientes para PVRIG y TIGIT se generaron como se describe en los métodos suplementarios. El análisis de expresión se realizó para examinar la expresión de PVRIG en bazo, nódulo linfático, y tumor en varios subconjuntos de células. Los ensayos celulares funcionales que demuestran una actividad moduladora de las células T para PVRIG de ratón se establecieron usando células T WT y PVRIG$^{-/-}$ y células diana que expresan ectópicamente PVRL2 Fc o PVRL2 como se detalla en los materiales y métodos suplementarios. Los modelos tumorales CT26, MC38, y B16/Db-hmgp100 se realizaron como se describe en los métodos suplementarios. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en la Universidad de Tel-Aviv (Tel-aviv, Israel) o Universidad Johns Hopkins (Baltimore, EE. UU.).

Resultados

La mayor expresión de PVRIG se da en células T efectoras de sangre periférica y tumores

La superfamilia Ig (IgSF) consiste en cientos de proteínas, pero solo unas pocas de ellas son receptores inhibidores de las células T. Las proteínas de la IgSF tienden a evolucionar rápidamente (24) y, por lo tanto, la similitud de secuencia entre estas proteínas es generalmente baja y no es óptima para identificar nuevos receptores inmunes. Para identificar nuevos puntos de control inmunes, desarrollamos algoritmos bioinformáticos basados en características genómicas y proteómicas compartidas entre los puntos de control inmunes conocidos, tales como estructura génica, dominios de proteínas, localización celular predicha y patrón de expresión. Usando estos algoritmos, se identificó PVRIG como un nuevo receptor inmune. Un informe también ha demostrado recientemente que PVRIG humano (CD112R) se une a PVRL2 e inhibe la función de las células T (15). Sin embargo, no se ha reportado la relevancia de esta ruta en la regulación de la vigilancia inmune de tumores. Aquí, hemos elucidado la expresión y función de PVRIG y PVRL2 en los cánceres humanos y en modelos tumorales preclínicos. En la sangre periférica de donantes sanos, PVRIG se expresaba exclusivamente en los linfocitos, con la mayor expresión en las células T CD8 y células NK (Figura 83A). Un análisis adicional de los subconjuntos de células T mostró la mayor expresión de PVRIG en subconjuntos de células T de memoria/efectoras CD8 o CD4 en comparación con el subconjunto de Treg (Figura 83B, Figura 90A). El patrón de expresión predominantemente en las células T de memoria diferencia a PVRIG de otros receptores en la familia (TIGIT, CD96) que tienden a tener una expresión igual o mayor en los Treg en comparación

con las células T de memoria/efectoras. Comparamos además las cinéticas de expresión de PVRIG y TIGIT después de la activación de las células T en 2 sistemas de ensayo (respuesta de recuerdo a CMV Figura 83C, DC-MLR Figura 83D, Figura 90B) y muestran que PVRIG tiene una cinética de inducción retrasada y una expresión más sostenida en el punto de tiempo tardío en comparación con TIGIT. La expresión preferencial de PVRIG células de memoria/efectoras en comparación con TIGIT sugiere un papel único para PVRIG en la regulación de las respuestas de las células T.

La inducción retrasada y sostenida de la expresión de PVRIG en las células T después de la activación, sugirió que podría expresarse en el microentorno tumoral. A continuación, analizamos la expresión de PVRIG en leucocitos de tumores humanos disociados directamente ex vivo por FACS. La expresión de PVRIG se detectó en células T CD8, células T CD4, y células NK de múltiples tipos de tumor (Figura 83E-G, Figura 90C). PVRIG se coexpresaba con PD-1 y TIGIT en las células T CD4 y CD8 (Figura 83F). De promedio, la mayor expresión se detectó en TIL $CD4^+$ y $CD8^+$ de tumores de mama, endometriales, de cabeza y cuello, pulmón, riñón, y ovario en comparación con vejiga, colorrectal, y próstata. En las muestras tumorales en las que la expresión de PVRIG era baja/no presente ex vivo, la activación con anti-CD3 y anti-CD28 aumentó la expresión de PVRIG, lo que sugiere que la expresión de PVRIG en TIL puede inducirse adicionalmente después de la reactivación (Figura 90D). Para los tumores de colon, pulmón, riñón, endometrial, y de ovario, fuimos capaces de obtener tejido normal adyacente del mismo paciente y realizar una comparación de la expresión de PVRIG en linfocitos aislados del tejido tumoral frente a normal. Los TIL mostraron una inducción significativa de PVRIG en las células T CD4 y CD8 en comparación con las células aisladas de tejidos normales adyacentes concordantes (NAT) (Figura 90E). Como con las PBMC, comparamos además la expresión de PVRIG, TIGIT, y PD1 en los Treg frente a las células T CD8 de tumores de pulmón, endometrial, y de riñón. En los TIL, la expresión de TIGIT fue mayor en los Treg en comparación con las células T CD8, mientras para PVRIG y PD1, se observó una expresión similar o mayor en las células T CD8 en comparación con los Treg (Figura 83H). A continuación, examinamos la corregulación de PVRIG, TIGIT, y PD-1 en poblaciones de células T por análisis de correlación bien de la magnitud de la expresión en los TIL ex vivo o la magnitud de las veces de cambio en la expresión entre tumor y NAT. En ambos análisis, las células T CD4 y CD8 presentaron una correlación positiva y significativa entre PVRIG y PD1 o TIGIT en (Figura 90F). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que PVRIG se expresa em las células T y células NK de múltiples cánceres humanos, situando a PVRIG como un nuevo receptor inhibidor diana que puede ser crítico en la regulación de la función de las células T en el tumor.

La expresión de PVRL2 está aumentada en tejido tumoral en comparación con tejido normal adyacente

Como se ha demostrado que la expresión de PD-L1 ayuda a predecir las respuestas a inhibidores de PD-1, examinamos si la expresión de PVRL2 era concomitante con la expresión de su receptor cognado, PVRIG, en tejidos de cáncer humano. Usando un anticuerpo anti-PVRL2 que validamos para tinción de muestras FFPE (Figura 91A), teñimos micromatrices de tumor (TMA) compuestas por tejidos de cáncer de pulmón, colon, piel, mama, ovario/endometrial, y de riñón y se puntuó cada núcleo sobre la base de la prevalencia e intensidad de la expresión de PVRL2. La expresión de PVRL2 no estaba presente o se expresaba mínimamente en la mayoría de las muestras de tejido normal de estos órganos. En los tejidos tumorales, la expresión de PVRL2 en las células tumorales se detectó en el ~50-70 % de cánceres de pulmón, colon, mama, y ovario/endometrial (Figura 84A, 84F). La expresión en muestras de cáncer de riñón varió del 20-40 %, mientras la expresión en melanoma fue la menor (~10 %) (Figura 84A, 84F). La expresión de PVRL2 se detectó en células tumorales y células inmunes en el frente invasivo (Figura 84B). Para determinar los subconjuntos de células inmunes específicos que expresan PVRL2, realizamos citometría de flujo en tumores recién disociados. La expresión de PVRL2 se detectó en células inmunes $CD45^+$, particularmente, células mieloides (p. ej., macrófagos asociados a tumor (TAM) $CD14^+$ y DC mieloides) y en células no inmunes $CD45^-$ de múltiples tipos de tumor (Figura 84C, D). No se detectó expresión de PVRL2 en linfocitos (datos no mostrados). La comparación de la expresión de PVRL2 en células $CD45^-$ y TAM aislados de tumores de colon, pulmón, riñón, endometrial, y de ovario, mostró una inducción significativa de PVRL2 en células aisladas del tumor en comparación con células aisladas de NAT concordante del mismo donante (Figura 92). Para las muestras donde obtuvimos expresión de PVRIG y PVRL2, examinamos la expresión de PVRIG en linfocitos comparado con PVRL2 en células mieloides y $CD45^-$ de múltiples tipos de tumor. De los tipos de cáncer examinados, los cánceres de endometrio, de pulmón, y de riñón tenían la mayor prevalencia de linfocitos $PVRIG^{alto}$ y TAM $PVRL2^{alto}$ o células no inmunes $CD45^-$ (Figura 842E, Figura 93). Integrando los datos de estudios de TMA y tumor disociados, demostramos que los tumores de mama, endometrial, pulmón, cabeza y cuello, riñón y ovario pueden ser representativos de un tipo de tumor respondedor para el antagonismo de PVRIG.

En comparación con PD-L1, la expresión de PVRL2 está regulada y presente diferencialmente en tumores $PD\text{-}L1^-$

Como PVRIG y PD-1 pueden coexpresarse en linfocitos infiltrantes en tumor (TIL), también examinamos la coexpresión de PVRL2 y PD-L1 en el mismo tumor mediante la tinción de secciones seriadas del mismo TMA. La expresión de PVRL2 en las células tumorales se detectó claramente en muestras de tumor $PD\text{-}L1^-$ (como se define por tinción de PD-L1 no membranoso en las células tumorales o células inmunes) a una frecuencia y puntuación promedio similares en comparación con muestras $PD\text{-}L1^+$. (Figura 85A, Figura 84F). En las células inmunes, 3 de 5 tumores en los que la expresión de PVRL2 se detectó en las células inmunes también expresaron PD-L1 (datos no mostrados), pero los bajos números de muestras hicieron difícil concluir sobre la coexpresión en células inmunes de PD-L1 y PVRL2. La expresión de PVRL2 en células tumorales en tumores negativos para PD-L1 sugirió que la expresión de PVRL2 era más prevalente que PD-L1 en algunos tipos de tumor y que la toma como diana de esta ruta

puede ser particularmente efectiva en tumores PD-L1$^-$. Mientras PD-L1 se induce principalmente por IFN-γ como un mecanismo de resistencia adaptativa (28), PVRL2 se modula por el estrés genómico, daño en el ADN, y genes supresores de tumores (29,30). Para entender mejor la distinta regulación de PD-L1 y PVR/PVRL2, evaluamos a continuación la regulación de la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1 en líneas celulares tumorales y en DC derivadas de monocitos por exposición a varios estímulos inflamatorios (Figura 85D). El tratamiento de DC con señales proinflamatorias dio lugar generalmente a un incremento en la expresión de PVR, PVRL2, y PD-L1, demostrando que la expresión de PVR, PVRL2, y PD-L1 está incrementada después de la maduración de DC. Por el contrario, el tratamiento de células epiteliales con IFN-γ incrementó la expresión de PD-L1, pero no tuvo efecto en la alta expresión de línea base de PVRL2 (Figura 85E), apoyando la regulación diferencial de la expresión de PVRL2 en comparación con PD-L1 por IFN-γ. En resumen, estos descubrimientos indican que PD-L1 y PVRL2 pueden coregularse en las células presentadoras de antígeno (APC), tales como DC, pero pueden regularse diferencialmente en las células epiteliales. La presencia de PVRL2 en tumores negativos para PD-L1 sugiere que la toma como diana de esta ruta puede tener un beneficio potencial en pacientes que no responden a o progresan con inhibidores de PD-1.

CHA.7.518.1.H4(S241P) es un anticuerpo monoclonal humanizado de alta afinidad frente a PVRIG que disrumpe la interacción de PVRIG con PVRL2

Para examinar las consecuencias funcionales de antagonizar las interacciones PVRIG-PVRL2 humanos, generamos un anticuerpo anti-PVRIG antagonista de alta afinidad, CHA.7.518.1.H4(S241P), que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2. Este anticuerpo se unió selectivamente a células HEK293 que expresan ectópicamente PVRIG humano o PVRIG de macaco cynomolgus y también se unió a células Jurkat que expresan de forma endógena PVRIG con una afinidad subnanomolar (Figura 86A). En ensayos bioquímicos, CHA.7.518.1.H4(S241P) bloqueó la interacción de PVRIG Fc con células HEK293 PVRL2$^+$ (Figura 86B) y también bloqueó la unión de PVRL2 Fc a células HEK293 PVRIG$^+$ (Figura 86C). Usando este anticuerpo, observamos un efecto funcional de un anti-PVRIG antagonista en varios ensayos de células T. Se generaron células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) que expresan ectópicamente un anticuerpo anti-CD3 en la superficie celular y PVRL2 humano y se cocultivaron con células T CD4 primarias humanas, bien en presencia de anti-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P)) o control de isotipo. La expresión de PVRIG se indujo en células T CD4 proliferantes después del cocultivo con la aAPC CHO anti-CD3 (Figura 94A). El antagonismo de PVRIG con CHA.7.518.1.H4(S241P) aumentó la proliferación de las células T CD4 de múltiples donantes (Figura 86D). También ensayamos el efecto de anti-PVRIG en 2 líneas de células T CD8 humanas reactivas para gp100 que se obtuvieron de tumores de melanoma. Estas líneas de células T se cocultivaron individualmente con aAPC que expresan HLA-A2 y PVRL2 (Figura 94B) en presencia de anticuerpos de control de isotipo IgG o anti-PVRIG. Como se observa en ambas líneas, anti-PVRIG incrementó la producción de IFN-γ y TNF-α un ~20-50 %. En una evaluación de la respuesta a la dosis, CHA.7.518.1.H4(S241P) presentó valores de CE50 de un dígito nanomolar en múltiples ensayos (Figura 94C, D). Estos datos demuestran colectivamente que el antagonismo de las interacciones PVRIG-PVRL2 con CHA.7.518.1.H4(S241P) dio lugar a una activación incrementada de las células T.

CHA.7.518.1.H4(S241P) en combinación con inhibidores de TIGIT o PD-1 dio lugar a un aumento sinérgico de la función de las células T.

La combinación del bloqueo de PVRIG y TIGIT incrementó sinérgicamente la función de las células T CD4 en un ensayo de cocultivo de células T-células dendríticas (15), lo que sugiere un papel para esta ruta en la regulación de las interacciones células T-APC. No se han reportado los efectos del bloqueo de PVRIG y TIGIT en las células T CD8 en un entorno de cocultivo de células tumorales. Como nuestro perfilado de expresión tumoral demostró la expresión de PVRL2 en células inmunes CD45$^-$, exploramos adicionalmente el efecto de tomar como diana esta ruta en cocultivos de células T-células tumorales usando 2 sistemas de ensayo de células T. En primer lugar, realizamos un cocultivo de 2 líneas de células T CD8 específicas de antígeno tumoral gp100 con una línea celular de melanoma, MEL624, en presencia de anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, o de control de isotipo, bien individualmente o en combinación. Las células MEL624 expresan tanto PVR como PVLR2 y tanto TIL-209 como TIL-463 expresaban PVRIG, TIGIT, y PD-1 (Figura 86F). En TIL-209, observamos que anti-PVRIG o anti-TIGIT solos no incrementaban IFN-γ y que la combinación de anti-PVRIG y anti-TIGIT incrementó sinérgicamente la producción de IFN-γ (Figura 86G). En TIL-463, observamos que anti-PVRIG o anti-TIGIT incrementaban modestamente la producción de IFN-γ, y que la combinación de anti-PVRIG y anti-TIGIT incrementaba de forma aditiva IFN-γ (Figura 86G). En un sistema de ensayo adicional, utilizamos células T CD8 reactivas para CMVpp65 como un sistema modelo para estudiar las respuestas de las células T humanas. Las células T CD8 HLA-A2$^+$ CMVpp65 se expandieron en presencia de CMVpp65 (495-503) y la expresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1 se observó en el día 10 (Figura 86F). PVRIG se expresó en células T CD8 específicas de CMVpp65 a una magnitud similar a la que se observó en muestras de cáncer humano (Figura 83). Como células diana, identificamos una línea de células cancerosas HLA-A2$^+$ PD-L1^{alto} (Panc05.04) y PD-L1^{bajo} (Colo205) que ambas expresaban cantidades similares de PVR y PVRL2 (Figura 86F). A continuación, realizamos un cocultivo de las células T reactivas para CMVpp65 con líneas celulares tumorales HLA-A2$^+$ pulsadas con el péptido pp65 (495-503) en presencia de anticuerpos bloqueantes frente a PVRIG, TIGIT, y/o PD-1. Observamos que el Ab anti-PVRIG incrementó IFN-γ un ~50 % en el cocultivo con células Panc05.04 y mínimamente en el cocultivo con Colo205 (Figura 86I). La combinación de Ab anti-TIGIT con anti-PVRIG incrementó sinérgicamente la producción de IFN-γ en ambas líneas celulares diana, dando lugar a un mayor incremento en IFN-γ en comparación con el anticuerpo frente a PD-1 solo (Figura 86H). La combinación de anti-PVRIG y anti-PD-1 también dio lugar a un incremento sinérgico en la producción de IFN-γ en comparación con el anticuerpo individual (Figura 86I). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren una

sinergia potente de la combinación del bloqueo de PVRIG y TIGIT o PVRIG y PD1 en el incremento de la activación de células T CD8 humanas después de la interacción con células tumorales.

La deficiencia de PVRIG dio lugar a una proliferación incrementada de las células T y a un crecimiento tumoral reducido

Aunque la secuencia para PVRIG de ratón y su interacción con PVRL2 de ratón se han reportado, el perfil de expresión y la actividad moduladora inmune de PVRIG de ratón no se entiende bien. En primer lugar, analizamos la expresión del ARN de mPVRIG y transcrito en células NK, KT y T (Figura 87A). Las células T CD8 de ratón activadas tenían transcritos elevados de PVRIG con cinéticas de inducción retrasadas en comparación con TIGIT (Figura 87B). Confirmamos que la mPVRIG recombinante se unía a la proteína mPVRL2 por resonancia de plasmón superficial (SPR) y ELISA realizados en varias orientaciones de ensayo (Figura 95A-D). También observamos una interacción entre mPVRIG y mPVR, aunque la afinidad fue aproximadamente 10x menor que la interacción con mPVRL2 (Figura 95E). Para determinar si PVR o PVRL2 es el ligando dominante para mPVRIG, ensayamos la unión de PVRIG Fc de ratón a células B16F10 que expresan PVR y PVRL2 (datos no mostrados). PVRIG Fc mostró una unión dependiente de la dosis a las células B16F10 que se suprimió completamente después de la inactivación por ARNsi de PVRL2 en las células B16F10 (Figura 95F). En comparación, la unión de la proteína de fusión PVRIG Fc se redujo ligeramente, pero de forma consistente, después de la inactivación de PVR (Figura 95F) lo que sugiere que se produce una interacción muy débil entre mPVRIG y mPVR. Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran que, en ratones, PVRL2 es el ligando principal para PVRIG, como es el caso en los seres humanos.

Para delinear el papel de PVRIG en las respuestas inmunes, generamos ratones deficientes en PVRIG ($^{-/-}$) (Figura 96). Los ratones PVRIG$^{-/-}$ nacieron en las relaciones mendelianas esperadas, no presentaron un fenotipo evidente hasta los 10 meses de edad, y a las 8 semanas de edad tenían una celularidad de leucocitos similar (tejido periférico y linfoide) cuando se compararon con ratones de tipo salvaje (Figura 97). Las células T CD8 de tipo salvaje (WT) y las células NK expresan PVRIG y la ausencia de expresión de PVRIG se detectó en las células PVRIG$^{-/-}$ (Figura 87C). Para examinar el papel de PVRIG en la regulación de las respuestas de las células T de ratones, examinamos la proliferación de células T WT y PVRIG$^{-/-}$ en 2 sistemas de ensayo. Las células T WT o PVRIG$^{-/-}$ se activaron con anti-CD3 inmovilizado en presencia de PVRL2 Fc soluble o proteína Fc control. La PVRL2 Fc soluble inhibió significativamente la proliferación de las células T CD4$^+$ WT pero no la proliferación de las células T CD4$^+$ PVRIG$^{-/-}$ (Figura 87D), lo que sugiere que las células PVRIG$^{-/-}$ carecen de una señal inhibidora. Para evaluar el papel de PVRIG de ratón en la interacción de las células T CD8$^+$ con las células tumorales, los ratones PVRIG$^{-/-}$ se cruzaron con ratones transgénicos pmel TCR, que expresan un TCR transgénico específico para $gp100_{25-33}$ (28). Las células T Pmel CD8+ PVRIG$^{-/-}$ o WT activadas se cocultivaron con células tumorales de melanoma B16-Db/gp100 que expresan de forma endógena PVRL2 (datos no mostrados) y se evaluó la activación y la función efectora. Las células T pMel CD8$^+$ PVRIG$^{-/-}$ mostraron una desgranulación y producción de citoquinas efectoras aumentadas (IFN-γ y TNF-α) en comparación con las células WT (Figura 87E). Estos datos indican que PVRIG de ratón inhibe la activación y la función efectora de las células T específicas de tumor después del cocultivo con células tumorales diana PVRL2$^+$.

A continuación, estudiamos los efectos de la deficiencia de PVRIG en el crecimiento tumoral en el modelo singénico MC38. Los ratones PVRIG$^{-/-}$ presentaron un crecimiento tumoral significativamente reducido en comparación con los ratones WT ($p < 0,05$; Figura 88A-B). Además, el bloqueo de PD-L1 empezó en el día 14, amplificando además las respuestas antitumorales y reduciendo el crecimiento tumoral en los ratones PVRIG$^{-/-}$ en comparación con los ratones WT tratados con anti-PD-L1 ($p=0,052$) (Figura 88C-D). Para evaluar los efectos funcionales del bloqueo de PD-L1 en microentornos tumorales PVRIG$^{-/-}$ y WT, recogimos tumores y nódulos linfáticos drenantes de tumores de cada una de las cuatro cohortes experimentales en el día 18, cuando los grupos habían recibido 2 dosis de isotipo o anti-PD-L1, pero no se observaron diferencias en el volumen tumoral, y se realizó citometría de flujo para determinar la composición del subconjunto inmune y las citoquinas intracelulares. El transporte de células inmunes (CD45$^+$) en tumores PVRIG$^{-/-}$ aumentó moderadamente (88 % respecto a los tumores WT) como lo hicieron las células T CD8$^+$ (92 % en comparación con los tumores WT) y las células T CD8$^+$ productoras de IFN-γ (incremento del 110 % sobre los tumores WT; Figura 88E). En combinación con el bloqueo de PD-L1, la infiltración de células CD45$^+$ se incrementó significativamente en los tumores PVRIG$^{-/-}$ (160 % respecto a los tumores de ratones WT tratados con anti-PD-L1; $p = 0,032$; Figura 88F). Los tumores PVRIG$^{-/-}$ tratados con anti-PD-L1 también tuvieron mayores números de células T CD8$^+$ totales por peso tumoral (incremento del 252 %) y células T CD8$^+$ productoras de IFN-γ (incremento del 297 %), en comparación con los tumores WT tratados con anti-PD-L1 (Figura 88F). También observamos que los ratones PVRIG$^{-/-}$ tenían números inalterados de células T CD4$^+$ efectoras infiltrantes en tumor y Treg Foxp3$^+$ independientemente del bloqueo de PD-L1 (datos no mostrados). El rescate de la disfunción inmune en tumores PVRIG$^{-/-}$, particularmente después del bloqueo de PD-L1, se reflejó en los nódulos linfáticos drenantes del tumor que tuvieron frecuencias incrementadas de células T CD8$^+$ efectoras IFN-γ$^+$TNF-α$^+$ respecto a ratones WT tratados con anti-PD-L1 (Figura 88G-H). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que la ablación de PVRIG, da lugar a un crecimiento tumoral reducido asociado con una respuesta inmune antitumoral incrementada, en particular cuando se combina con un tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1.

El anticuerpo anti-mPVRIG inhibió el crecimiento tumoral en combinación con el anticuerpo frente PD-1 o deficiencia de TIGIT

Después de demostrar que la deficiencia genética de PVRIG daba lugar a un crecimiento tumoral reducido, a continuación, nos planteamos demostrar que la inhibición mediada por anticuerpo de la interacción PVRIG-PVRL2

podría mejorar la inmunidad antitumoral, en particular en combinación con inhibidores de PD1 o TIGIT como demostraban nuestros datos humanos in vitro. Para evaluar esto, generamos un anticuerpo anti-mPVRIG antagonista de alta afinidad. Las evaluaciones de la afinidad del mAb anti-mPVRIG determinadas por FACS mostraron una Kd subnanomolar (0,33 nM en HEK293 mPVRIG, 0,39 nM en células D10.G4.1), similar a CHA.7.518.1.H4(S241P) (Figura 95G-H). La especificidad de este anticuerpo se confirmó adicionalmente al suprimirse la mayoría de la unión a células D10.G4.1 después de la inactivación de mPVRIG (Figura 95I). El anti-mPVRIG se ensayó para determinar la disrupción de la interacción mPVRIG-mPVRL2 mediante la inhibición de la unión de mPVRIG Fc a B16F10 y la unión de mPVRL2 Fc a células HEK293 que sobreexpresan mPVRIG (Figura 89A). El bloqueo completo de la interacción PVRIG-PVRL2 por el anticuerpo anti-mPVRIG se observó en ambos formatos de ensayo (Figura 89A, Figura 95J), demostrando que es un anticuerpo anti-mPVRIG antagonista. A continuación, ensayamos la eficacia in vivo del bloqueo de mPVRIG en un modelo de tumor de colon subcutáneo singénico CT26. La expresión de PVRIG estaba elevada en las células NK y T en el microentorno tumoral, en comparación con los subconjuntos de bazo o nódulos linfáticos drenantes correspondientes (Figura 89B). El tratamiento de ratones que portaban tumor con el mAb bloqueante anti-mPVRIG como monoterapia no redujo el crecimiento tumoral (datos no mostrados). Sin embargo, la combinación de los mAb anti-PVRIG y anti-PD-L1 retrasó efectivamente el crecimiento del tumor CT26 (Figura 89C) e incrementó significativamente la supervivencia de los ratones tratados con una tasa del 40 % de respondedores completos (Figura 89D). Consistentes con nuestros datos en el ensayo de células T humanas, estos datos demuestran que la combinación de inhibidores de PD-1 y PVRIG puede reducir el crecimiento tumoral.

También ensayamos el efecto de la ablación tanto la señalización de PVRIG como de TIGIT en la regulación de las respuestas antitumorales. Para estos estudios, ensayamos la eficacia del anticuerpo anti-mPVRIG en ratones WT o TIGIT$^{-/-}$ inoculados con células de melanoma B16F10/Db-hmgp100. El tratamiento de los ratones WT que portaban tumor con mAb anti-mPVRIG bloqueante tuvo un efecto menor en comparación con el tratamiento de isotipo (17 % TGI en el día 11 y 8 % TGI en el punto final, día 18). El efecto de la deleción de TIGIT en el crecimiento tumoral fue también menor, en comparación con el grupo control WT (17 % TGI en el día 11 y 13 % TGI en el punto final). Sin embargo, cuando la deleción de TIGIT se combinó con el tratamiento con mAb anti-PVRIG, se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral (63 % en el día 11 y 49 % TGI en el punto final (Figura 89E, F). De acuerdo con la inhibición del crecimiento tumoral, los ratones TIGIT$^{-/-}$ tratados con el mAb anti-PVRIG 407 presentaron una supervivencia incrementada en comparación con el grupo control WT, sin embargo, no se consiguió una significancia estadística en este modelo de tumor agresivo de crecimiento rápido (datos no mostrados). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran una actividad sinérgica de los inhibidores de PVRIG con los inhibidores de PD1 o TIGIT y están de acuerdo con nuestros datos funcionales humanos proporcionando la base racional para el ensayo clínico de CHA.7.518.1.H4(S241P) con inhibidores de PD1 o TIGIT.

Discusión

Aunque los anticuerpos dirigidos a los puntos de control inmunes de las células T, tales como CTLA4 y PD-1, han incrementado la supervivencia de los pacientes con cáncer, la mayoría de los pacientes con cáncer todavía no presentan un beneficio clínico. Una posible razón para esto es la presencia de reguladores adicionales de las células T que inhiben la inmunidad antitumoral de las células T. Aquí, elucidamos el papel de PVRIG en la regulación de la función efectora de las células T y demostramos que el antagonismo de PVRIG incrementa las respuestas antitumorales de las células T y reduce el crecimiento tumoral.

PVRIG es un nuevo miembro de la familia de la nectina y semejantes a nectina, lo que le sitúa entre varios receptores inmunoreguladores conocidos en la familia. La comprensión de la interacción de los receptores en esta familia es crucial para entender la relevancia y el mecanismo de acción de PVRIG. De estos receptores, DNAM, TIGIT, y CD96 son los que están más relacionados con PVRIG en términos de compartir los mismos ligandos, PVR y PVRL2. DNAM se une tanto a PVR como a PVRL2 y suministra una señal coestimuladora a los linfocitos. Se reporta que TIGIT se une a PVR y débilmente a PVRL2. Fuimos incapaces de detectar una interacción entre TIGIT y PVRL2 usando ELISA o SPR (datos no mostrados), lo que sugiere que PVR es el ligando dominante para TIGIT. Usando métodos similares, nosotros y un informe reciente detectamos una interacción de alta afinidad entre PVRL2 y PVRIG, lo que sugiere que PVRIG es el receptor inhibidor dominante para PVRL2. Estos datos sugieren que TIGIT y PVRIG comprenden nodos de señalización duales en este eje y que es necesario el bloqueo de ambos para un incremento máximo de la activación de las células T en esta familia. Además de interaccionar con diferentes ligandos, observamos que PVRIG tiene la mayor expresión en células T efectoras o de memoria, de manera similar a PD-1, mientras TIGIT tiene la mayor expresión en las células T reguladoras. Además, observamos que PVRIG presentaba una inducción tardía después de la activación de las células T en comparación con TIGIT. Estos datos sugieren que PVRIG tiene un papel único en esta familia, interaccionando con alta afinidad con PVRL2 y teniendo una expresión diferenciada en las células de memoria y un perfil de inducción tardío respecto a TIGIT.

Aquí se reporta el nuevo papel de PVRIG en la regulación de las respuestas antitumorales de las células T usando ratones deficientes en PVRIG y anticuerpos antagonistas anti-PVRIG. Se ha demostrado aquí que el PVRIG de ratón se expresaba en las células T y en las células NK, se inducía después de la activación de los linfocitos, y es mayor en el TME en comparación con la periferia. Además, mostramos que la deficiencia de PVRIG da lugar a una función incrementada de las células T in-vitro y a un crecimiento tumoral reducido in-vivo. Un anticuerpo antagonista frente a PVRIG redujo el crecimiento tumoral cuando se combinó con anti-PD-L1 o deficiencia genética de TIGIT, lo que demuestra un papel necesario de PVRIG en la regulación de las respuestas de las células T. Estos nuevos datos

proporcionan una prueba se concepto in vivo usando modelos tumorales preclínicos de que la toma como diana de PVRIG en combinación con antagonismo de PD1 o TIGIT es una nueva terapia potencial para el tratamiento de los cánceres.

Aquí se reporta un anticuerpo anti-PVRIG humano de alta afinidad que disrumpe la interacción de PVRIG y PVRL2 que queremos llevar adelante en ensayos clínicos. Para determinar las indicaciones potenciales en el cáncer que podrían proporcionar información sobre la selección de pacientes en ensayos clínicos, examinamos el perfil de expresión de este eje en cánceres humanos por FACS e IHC. Para PVRIG, observamos que la expresión media de PVRIG en células T CD4 y CD8 por FACS es mayor en cáncer endometrial, de pulmón, riñón, y ovario, aunque esta diferencia no consiguió una diferencia estadística con otros tipos de cáncer, según se determina por ANOVA con un ensayo de comparación múltiple de Tukey con el número actual de muestras. Como PVRIG se induce después de la activación de las células T y dado que la mayoría de las células T infiltrantes en tumores son experimentadas en antígeno, quizá no es sorprendente que la expresión media de PVRIG fuera similar entre las muestras tumorales y los tipos de cáncer. Observamos que la expresión de PVRIG se correlacionaba con la expresión de PD-1 y TIGIT, lo que sugiere que la interacción de estos 3 receptores inhibidores será importante en la regulación de la respuesta antitumoral. En este informe, observamos un incremento sinérgico en la función de las células T cuando se combinaron anticuerpos frente a PVRIG con anticuerpos frente a TIGIT en un cocultivo de células T CD8 células tumorales, mejor que PD-1 en combinación con inhibidores de PVRIG o TIGIT. Estos datos, junto con un estudio previo que demostró un papel para PVRIG y TIGIT en la regulación de las interacciones DC-células T, muestran que esta ruta podría estar implicada en la regulación de las interacciones células T-APC y células T-células tumorales, y proporcionar múltiples mecanismos mediante los que la toma como diana de PVRIG podría incrementar la respuesta inmune antitumoral.

Como la expresión de PD-L1 se ha correlacionado con la respuesta clínica a inhibidores de PD-1, también analizamos la expresión de PVRL2 en tumores por FACS e IHC para evaluar si determinados tipos de cáncer tienen una mayor expresión. Al evaluar las células tumorales disociadas, observamos que la expresión media de PVRL2 en macrófagos de muestras de endometrio, cabeza y cuello, riñón, pulmón, y ovario era mayor en comparación con otros tipos de tumor. La expresión media de PVRL2 en células no inmunes $CD45^-$ fue mayor en cánceres de mama, colorrectal, endometrial, pulmón, ovario, y próstata en comparación con otros cánceres. Sobre la base de la expresión de PVRIG y PVRL2, determinamos que los cánceres de endometrio, cabeza y cuello, pulmón, riñón, y ovario tienen una mayor incidencia de tumores con una alta expresión de PVRIG y PVRL2 y que estos eran cánceres potenciales que podrían responder a los inhibidores de esta ruta.

Se observó aquí que la expresión de PVRL2 puede modularse en las células productoras de antígeno in vitro por mediadores inflamatorios, mientras la expresión de PVRL2 en las células cancerosas no se alteró. Estos datos sugieren que la expresión de PVRL2 en las células presentadoras de antígeno puede regularse por la inflamación y podría ser un indicador de un tumor inflamado. De hecho, observamos que todos los tumores PD-L1+ también expresaban PVRL2, tanto en las células tumorales como en el compartimento inmune. La expresión de PVRL2 en las células mieloides podría ayudar a predecir las respuestas a los inhibidores de PVRIG en un entorno de combinación con PD-1 o TIGIT para aumentar adicionalmente el efecto antitumoral. De forma interesante, una parte de los tumores negativos para PD-L1 también expresaban PVRL2, principalmente en las células tumorales y no en las células inmunes. Se reporta que la expresión de PVR y PVRL2 en las células epiteliales está inducida en la tumorogénesis, así como en la respuesta al stress y daño en el ADN. Estos datos son consistentes con los descubrimientos *in vitro* de que la regulación de la expresión de PVRL2 en las células tumorales no depende de IFN-g. Como PD-L1 está inducido en un entorno de resistencia adaptativa en respuesta a IFN-g y está asociado con una respuesta inflamatoria, la expresión de PVRL2 en ausencia de PD-L1 sugiere que la expresión de PVRL2 es más prevalente que PD-L1 y que PVRL2 se expresa en los tumores no inflamados. Sobre la base de lo anterior, es posible que la presencia de PVR y PVRL2 contribuya a suprimir las respuestas inmunes, independientemente de PD-L1 y que los inhibidores de PVRIG y TIGIT podrían tener una importancia particular en los pacientes que son negativos para PD-L1 o no respondedores a/que progresan con los inhibidores de PD-1.

En resumen, este informe proporciona varias nuevas informaciones sobre la biología de PVRIG, incluyendo la caracterización de la expresión de este eje en cánceres humanos, demostrando un papel prominente para PVRIG/TIGIT en la regulación de la interacción células CD8-células tumorales, y mostrando que el antagonismo de PVRIG en combinación con la inhibición de PD-1 o deficiencia de TIGIT da lugar a una reducción sinérgica en el crecimiento tumoral. Estos datos extienden nuestra actual comprensión de la biología de PVRIG y proporcionan la base racional para el ensayo clínico de CHA.7.518.1.H4(S241P), un anticuerpo anti-PVRIG de alta afinidad, en pacientes con cáncer.

Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell **2000**; 100(1): 57-70.

2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generación. Cell **2011**;144(5):646-74 doi 10.1016/j.cell.2011.02.013.

3. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, *et al*. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol **2014**;232(2): 199-209 doi 10.1002/path.4287.

4. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. Immunity **2013**;39(1):74-88 doi 10.1016/j.immuni.2013.06.014.

5. Danilova L, Wang H, Sunshine J, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Xu H, *et al*. Association of PD- 1/PD-L axis expression with cytolytic activity, mutational load, and prognosis in melanoma and other solid tumors. Proc Natl Acad Sci U S A **2016**;113(48):E7769-E77 doi 10.1073/pnas.1607836113.

6. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nat Rev Cancer **2016**;16(5):275-87 doi 10.1038/nrc.2016.36.

7. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. Clin Cancer Res **2016**;22(8): 1856-64 doi 10.1158/1078-0432.CCR-15-1849.

8. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer **2012**;12(4):252-64 doi 10.1038/nrc3239.

9. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell **2015**;161(2):205-14 doi 10.1016/j.cell.2015.03.030.

10. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, *et al*. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. Sci Transl Med **2014**;6(238):238ra70 doi 10.1126/scitranslmed.3008211.

11. Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson R, Hornet B, Chodon T, *et al*. CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. Clin Cancer Res **2014**;20(9):2424-32 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-2648.

12. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, *et al*. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature **2014**;515(7528):568-71 doi 10.1038/nature 13954.

13. Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. Curr Opin Immunol **2012**;24(2):246-51 doi 10.1016/j.coi.2012.01.009.

14. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptores. Nat Rev Immunol **2015**;15(4):243-54 doi 10.1038/nri3799.

15. Zhu Y, Paniccia A, Schulick AC, Chen W, Koenig MR, Byers JT, *et al*. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. J Exp Med **2016**;213(2): 167-76 doi 10.1084/jem.20150785.

16. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, *et al*. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD 112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. J Exp Med **2003**;198(4):557-67 doi 10.1084/jem.20030788.

17. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, *et al*. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. Nat Immunol **2009**; 10(1):48-57 doi 10.1038/ni. l674.

18. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, *et al*. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A **2009**;106(42): 17858-63 doi 10.1073/pnas.0903474106.

19. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, *et al*. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. Cancer Cell **2014**;26(6):923-37 doi 10.1016/j.ccell.2014.10.018.

20. Zhang B, Zhao W, Li H, Chen Y, Tian H, Li L, *et al*. Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human citoquina-induced killer cells by interacting with CD155. Cancer Immunol Immunother **2016**;65(3):305-14 doi 10.1007/s00262-016- 1799-4.

21. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, *et al*. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. Nat Immunol **2014**;15(5):431-8 doi 10.1038 .2850.

22. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-diana cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD 155). J Immunol **2004**; 172(7) :3994-8.

23. Machlenkin A, Uzana R, Frankenburg S, Eisenberg G, Eisenbach L, Pitcovski J, *et al*. Capture of tumor cell membranes by trogocytosis facilitates detection and isolation of tumor-specific functional CTLs. Cancer Res **2008**;68(6):2006-13 doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-3119.

24. Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. Immuno genetics **2011**;63(7):417-28 doi 10.1007/s00251-011-0519-7.

25. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, *et al*. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med **2012**;4(127): 127ra37 doi 10.1126/scitranslmed.3003689.

26. Cerboni C, Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Doria M, Cippitelli M, *et al*. The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D y DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. Front Immunol **2014**;4:508 doi 10.3389/fimmu.2013.00508.

27. de Andrade LF, Smyth MJ, Martinet L. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. Immunol Cell Biol **2014**;92(3):237-44 doi 10.1038/icb.2013.95.

28. Overwijk WW, Tsung A, Irvine KR, Parkhurst MR, Goletz TJ, Tsung K, *et al*. gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. J Exp Med **1998**;188(2):277-86.

S. Ejemplo 19: ensayo de muerte de las células tumorales

El efecto de un anticuerpo anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P), bien solos o en combinación, en la muerte de las células tumorales se evaluó por un ensayo de cocultivo in vitro con células T $CD8^+$ humanas específicas de CMV. Las líneas celulares diana HLA-$A2^+$ usadas en el ensayo fueron la línea celular de melanoma, Mel624, que expresa de forma estable PVR y PVRL2 humanos, y la línea celular de adenocarcinoma pancreático, Panc05.04, que expresa niveles endógenos de PVR y PVRL2 humanos. Ambas líneas celulares tumorales se transdujeron de forma estable con un gen informador de luciferasa a través de transducción lentiviral (System Biosciences). Las células Mel624 y Panc05.04 se pulsaron con el péptido de CMV pp65 a 0,0033 µg/ml o 0,01 µg/ml a 37 °C durante 1 hora, respectivamente. Las células se lavaron entonces y se sembraron en placas a 20.000 células/pocillo. Se añadió un anticuerpo de referencia anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P) al cultivo en combinación, o con un anticuerpo de control de isotipo hIgG4 a 10 µg/ml. Las células T CD8+ humanas específicas de CMV de tres donantes diferentes, especificados como Donante 4, Donante 72, y Donante 234, se añadieron a 100.000 células/pocillo. Los cocultivos se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Después de la incubación, las placas se retiraron del incubador y se dejó que se equilibraran hasta temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió sustrato de luciferasa Bio-Glo (Promega) a cada pocillo y la mezcla se equilibró durante 10 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. La luminiscencia o unidades de luz relativas (RLU) se cuantificó en un lector de múltiples marcajes En Vision (Perkin Elmer) con un detector de luminiscencia ultrasensible. Se calculó el porcentaje de muerte específica por [(RLU para el anticuerpo de tratamiento - RLU para el medio solo)/RLU para el medio solo] x 100.

Resultados

La Figura 99A y B muestran el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-TIGIT y CHA.7.518.1.H4(S241P) en la muerte de las células Mel624 y Panc05.04, respectivamente. Cuando se añaden al cocultivo solos, tanto el anticuerpo anti-TIGIT como CHA.7.518.1.H4(S241P) indujeron una muerte significativa por las células T de las líneas celulares tumorales en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. Para el anticuerpo anti-TIGIT, el porcentaje de muerte específica varió del 19-41 % para las células Mel624, y del 3-44 % para las células Panc05.04 en los 3 diferentes donantes reactivos para CMV ensayados. Para CHA.7.518.1.H4(S241P), el porcentaje de muerte específica varió del 16-20 % para las células Mel624, y del 0,21-29 % para las células Panc05.04. En algunos casos, se observó un efecto aditivo en la muerte de las células tumorales en el tratamiento combinado del anticuerpo anti-TIGIT y CHA.7.518.1.H4(S241P).

Para determinar si el efecto de un anticuerpo anti-TIGIT y CHA.7.518.1.H4(S241P) en la muerte de las células tumorales era dependiente de la dosis, el ensayo se llevó a cabo con una serie de dilución de 2 veces de 10 puntos para cada anticuerpo empezando en 0,5 µg/ml para los anticuerpos anti-TIGIT, y 10 µg/ml para CHA.7.518.1.H4(S241P) (Figura 100). La muerte de Mel624 disminuyó de una manera dependiente de la dosis cuando el anticuerpo anti-TIGIT, BM26 o CPA.9.086, se combinaron con CHA.7.518.1.H4(S241P). Se observó una muerte más potente para la combinación de CPA.9.086 y CHA.7.518.1.H4(S241P) con una CE_{50} de 0,40 ± 0,49 nM, en comparación con la combinación de BM26 y CHA.7.518.1.H4(S241P) con una CE_{50} de 2,6 ± 1,7 nM.

T. Ejemplo 20: medición biofísica de K_D

Los experimentos en equilibrio KinExA se realizaron usando un instrumento KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Boise, ID, EE. UU.) a 22 °C. Se obtuvo TIGIT humano recombinante etiquetado con His de Sino Biologicals (Pekín, China) y se reconstituyó en 1XPBS. Todas las muestras de antígeno y anticuerpo para los análisis por KinExA se prepararon en tampón PBST desgasificado (PBS con tween 20 al 0,05 %) con 100 µg/mL de BSA filtrada y azida de sodio al 0,02 %. El anticuerpo secundario de detección usado fue anti-IgG humana de cabra marcado con Alexa Flour 647 (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluido 400 a 700 veces en el tampón PBST (con BSA y azida) descrito anteriormente de una preparación madre de 0,5 mg/mL en 1X PBS, pH 7,4. Para cada experimento de KinExA, se diluyeron ~20 µg de TIGIT humano en 1 mL de carbonato de sodio 50 mM, pH 9,2 que se añadió directamente a 50 mg de lechos de azlactona (Ultralink Support, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) y se agitaron de forma suave toda la noche a 4 °C. Después de la agitación suave, los lechos se lavaron una vez con tampón Tris 1 M, pH 8,5, que contenía 10 mg/mL de BSA y se agitaron de forma suave durante una hora a temperatura ambiente en el

mismo tampón. Se añadieron lechos acoplados al reservorio de lechos en el instrumento KinExA y se diluyó hasta ~30 mL con 1X HBS-N (Hepes 0,01 M, NaCl 0,15M, GE Healthcare) que contenía azida de sodio al 0,02 % que también fue el tampón de operación para el instrumento KinExA. Todos los lechos acoplados con antígeno se usaron inmediatamente después de su preparación.

Para dos mediciones replicadas de K_D para CPA.9.086 (Tabla 1), se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT que variaron de 957 aM-212 pM a temperatura ambiente durante ~72 horas con sitios de unión de CPA.9.086 2,5 pM y sitios de unión de CPA.9.086 1,8pM. Para CPA.9.083, se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT que variaron de 478 aM-196pM durante ~72 horas con sitios de unión de CPA.9.083 1,8pM. Para las mediciones en duplicado del anticuerpo de referencia, BM26 hIgG4, se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT que variaron de 9,6fM-3.53nM durante ~72 horas con sitios de unión de BM26 20pM y sitios de unión de BM26 8,0 pM. Para CHA.9.547.13, se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT que variaron de 10,5fM-2.2nM durante ~72 horas con sitios de unión del mAb CHA.9.547.13 8pM. El volumen que fluyó a través del paquete de lecho para cada muestra equilibrada para todos los experimentos varió de 4mL a 11mL a una velocidad de flujo de 0,25 mL/min. Los datos se ajustaron con un modelo de unión 1:1 "en equilibrio estándar" usando el software KinExA Pro (Versión 4.2.10; Sapidyne Instruments) para estimar la K_D y generar el intervalo de confianza del 95 % (IC) del ajuste de la curva.

Resultados

Tanto CPA.9.083 como CPA.9.086 se unieron a TIGIT humano con una afinidad de unión femtomolar, mientras CHA.9.547.13 y BM26 se unió con una afinidad picomolar. Así, CPA.9.083 y CPA.9.086 se unieron a TIGIT humano con la mayor afinidad de de los cuatro diferentes anticuerpos ensayados.

Tabla 1: Mediciones de K_D de los anticuerpos hIgG4 anti-TIGIT humano determinadas por KinExA

Anticuerpo	K_D ± IC del 95 % (n=1)	K_D ± IC del 95 % (n=2)
CHA.9.547.13	18,8 ± 5,8pM	No determinado
CPA.9.083	694 ± 277fM	No determinado
CPA.9.086	553 ± 230fM	665 ± 378fM
BM26	8,2 ± 2,8pM	11,2 ± 3,6pM

U. Ejemplo 21: desarrollo y caracterización funcional de CPA.9.086, un nuevo anticuerpo terapéutico dirigido al punto de control inmune TIGIT

Antecedentes: TIGIT es un receptor coinhibidor que está altamente expresado en los linfocitos, incluyendo células T CD4+ efectoras y reguladoras (Treg), células T CD8+ efectoras, y células NK, que se infiltran en diferentes tipos de tumores. La unión de TIGIT con sus ligandos reportados, receptor de poliovirus (PVR) y proteínas semejantes a PVR (PVRL2 y PVRL3) suprime directamente la activación de los linfocitos. PVR también se expresa ampliamente en los tumores, lo que sugiere que el eje de señalización TIGIT-PVR puede ser un mecanismo de escape inmune dominante para el cáncer. Reportamos aquí la caracterización biofísica y funcional de CPA.9.086, un anticuerpo terapéutico dirigido a TIGIT. También demostramos que el cobloqueo de TIGIT y un nuevo inhibidor del punto de control, PVRIG, aumenta las respuestas de las células T.

Materiales y Métodos: se llevaron a cabo campañas de descubrimiento de anticuerpos humanos por exposición en fago y de ratón por hibridoma para generar anticuerpos terapéuticos anti-TIGIT. Los anticuerpos resultantes se evaluaron para determinar su capacidad de unirse con alta afinidad a TIGIT humano recombinante y expresado en la superficie celular. También se examinó la reactividad cruzada de los anticuerpos con TIGIT de macaco cynomolgus y de ratón. Un subconjunto de anticuerpos que se unía con alta afinidad a TIGIT humano, y que reaccionaba de manera cruzada con TIGIT de cynomolgus, se caracterizó adicionalmente para determinar su capacidad de bloquear la interacción entre TIGIT y PVR. Los anticuerpos bloqueantes se cribaron por su capacidad de aumentar la activación de las células T específica de antígeno in vitro bien solos, o en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P).

Resultados: se identificó un anticuerpo líder, CPA.9.086, que se une a TIGIT humano con una alta afinidad femtomolar. Este anticuerpo se unía a TIGIT expresado de forma endógena en células T CD8+ humanas con una mayor afinidad que los anticuerpos de referencia ensayados, y también reaccionó de manera cruzada con TIGIT tanto de cynomolgus como de ratón. Cuando se ensayó para determinar su actividad in vitro, CPA.9.086 aumentó la secreción de citoquinas y la muerte de las células tumorales por células T CD8+ específicas de CMV con una potencia superior o equivalente a los anticuerpos de referencia ensayados. La combinación de CPA.9.086 con un anticuerpo anti-PD1 o CHA.7.518.1.H4(S241P) dio lugar a una actividad aumentada de las células T CD8+ específicas de CMV. Además, demostramos que TIGIT se expresa predominantemente en Treg y células T CD8+ efectoras de tumores sólidos en comparación con la sangre periférica, lo que sugiere que estas poblaciones serán probablemente la diana de CPA.9.086.

Conclusión: se describe el desarrollo de un anticuerpo frente a TIGIT antagonista de muy alta afinidad, CPA.9.086, que está actualmente en desarrollo preclínico. Postulamos que la afinidad femtomolar de CPA.9.086 podría dar lugar a una dosificación menor y menos frecuente en los pacientes. CPA.9.086 puede aumentar la activación de las células T humanas bien solo o en combinación con otros anticuerpos frente a puntos de control. Así, estos datos demuestran la utilidad de tomar como diana TIGIT, PD1, y PVRIG para el tratamiento del cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a TIGIT humano (SEQ ID NO:97) que comprende:

a) un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 160; y

b) un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 165.

2. Una composición según la reivindicación 1 en donde dicha composición es un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicha VH comprende la SEQ ID NO: 160; y

b) una cadena ligera que comprende VL-VC, en donde dicha VL que comprende la SEQ ID NO: 165 y VC es bien kappa o lambda.

3. Una composición según la reivindicación 2 en donde la secuencia de dicha CH1-bisagra-CH2-CH3 se selecciona de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas, y variantes de las mismas.

4. Una composición según la reivindicación 2 o 3 en donde dicha cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 164 y dicha cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 169.

5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que comprende además un segundo anticuerpo que se une a una proteína receptora de punto de control humana.

6. Una composición según la reivindicación 5 en donde dicho segundo anticuerpo se une a PD-1 humano.

7. Una composición según la reivindicación 5 en donde dicho segundo anticuerpo se une a PVRIG humano (SEQ ID NO:2).

8. Una composición según la reivindicación 7 en donde dicho segundo anticuerpo comprende un dominio de unión a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 5 y un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 10.

9. Una composición según la reivindicación 7 en donde la cadena pesada de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:9 y la cadena ligera de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO: 14.

10. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO: 160; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio ligero variable que comprende la SEQ ID NO: 165.

11. Una composición de ácido nucleico según la reivindicación 10 en donde dicho primer ácido nucleico codifica una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicha VH comprende la SEQ ID NO: 160; y dicho segundo ácido nucleico codifica una cadena ligera que comprende VL-VC, en donde dicha VL que comprende la SEQ ID NO: 165 y VC es el dominio lambda.

12. Una composición de vector de expresión que comprende un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico según la reivindicación 10 u 11 y un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico según la reivindicación 10 u 11, respectivamente.

13. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico según la reivindicación 10 u 11 y dicho segundo ácido nucleico según la reivindicación 10 u 11, respectivamente.

14. Una célula huésped que comprende dicha composición de vector de expresión según la reivindicación 12 o 13.

15. Un método para preparar un anticuerpo anti-TIGIT que comprende:

a) cultivar dicha célula huésped de la reivindicación 14 en condiciones en donde dicho anticuerpo se expresa; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

16. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento del cáncer mediante la activación de las células T.

FIG. 1

PVRIG WT Humano de Longitud Completa

Secuencia de PVRIG humano empezando desde la posición 21 - metionina alternativa

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIR
QWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLAGILGV
SGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATINTSCRPATLDTAHPHGGPSW
WASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVR

(SEQ ID NO: 1)

Secuencia de PVRIG humano empezando desde la metionina en la posición 1

MRTEAQVPALQPPEPGLEGAMGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWG
GPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPG
LSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATIN
TSCRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPR
GPRAMEGPLGVR

(SEQ ID NO: 2)

FIG. 2

Isoforma alfa de PVLR2 humano

>gi|5360210|ref|NP_002847.1| nectina-2 precursor de la isoforma alfa [Homo sapiens]

MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTW
QRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLSVRYPPEVSISGYDDNWYLGRTDAT
LSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIHAVDSLFNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
RASPRDVGPLVWGAVGGTLLVLLLLAGGSLAFILLRVRRRRKSPGGAGGGASGDGGFYDPKAQVLGNGDP
VFWTPVVPGPMEPDGKDEEEEEEEEKAEKGLMLPPPPALEDDMESQLDGSLISRRAVYV

(SEQ ID NO:3)

Isoforma delta de PVLR2 humano

>gi|112789532|ref|NP_001036189.1| nectina-2 precursor de la isoforma delta [Homo sapiens]
MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTW
QRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLSVRYPPEVSISGYDDNWYLGRTDAT
LSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIHAVDSLFNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
NTAGAGATGGIIGGIIAAIIATAVAATGILICRQQRKEQTLQGAEEDEDLEGPPSYKPPTPKAKLEAQEM
PSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQEMPRYHELPTLEERSGPLHPGATSLGSPIPVPPGPPAVEDV
SLDLEDEEGEEEEEYLDKINPIYDALSY

(SEQ ID NO:4)

Figura 3A

CHA.7.518.1.H4(S241P)

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS	5
vhCDR1	GYTFTDYN	6
vhCDR2	IYPYIGGS	7
vhCDR3	AREDKTARNAMDY	8
HC de longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9
Dominio ligero variable (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKLEIK	10
vlCDR1	ENIYSN	11
vlCDR2	EAT	12
vlCDR3	QHFWGTPYT	13
Cadena ligera de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	14

Figura 3B

CHA.7.538.1.2.H4(S241P)

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS	**15**
vhCDR1	GYAFTNYL	**16**
vhCDR2	INPGSGGI	**17**
vhCDR3	ARSETHDTWFAY	**18**
HC de longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**19**
Dominio ligero variable (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATY YCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK	**20**
vlCDR1	QSVRIA	**21**
vlCDR2	LAS	**22**
vlCDR3	LQHWNYPYT	**23**
Cadena ligera de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATY YCLQHWNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**24**

FIG. 4B

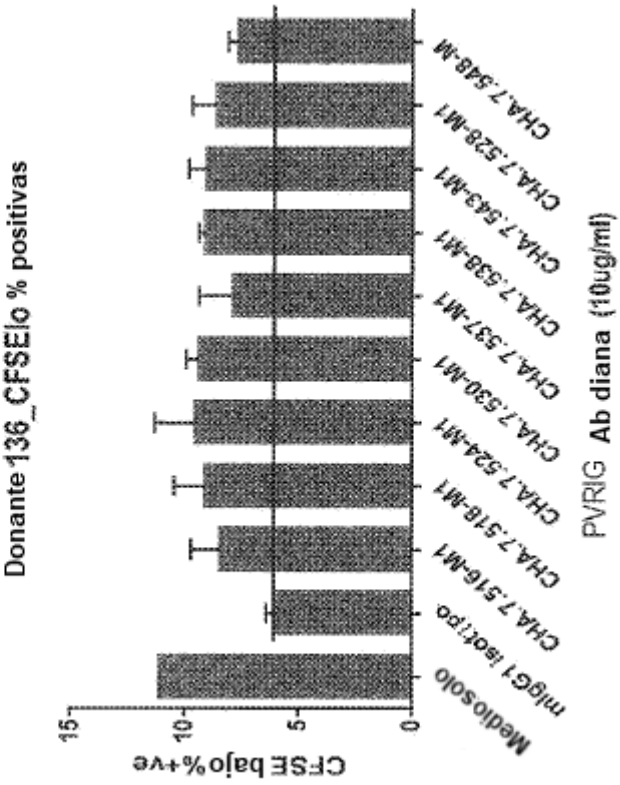

Donante136_CFSElo % positivas
CFSE bajo %+ve
15
10
5
0
Medio solo
mIgG1 isotipo
CHA.7.516-M1
CHA.7.518-M1
CHA.7.524-M1
CHA.7.530-M1
CHA.7.537-M1
CHA.7.538-M1
CHA.7.543-M1
CHA.7.528-M1
CHA.7.548-M
PVRIG Ab diana (10ug/ml)

FIG. 4A

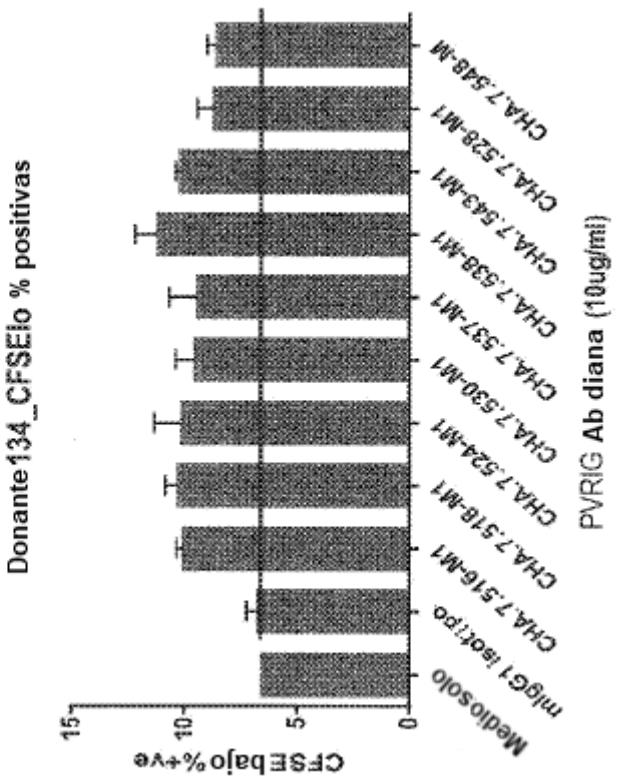

Donante134_CFSElo % positivas
CFSE bajo %+ve
15
10
5
0
Medio solo
mIgG1 isotipo
CHA.7.516-M1
CHA.7.518-M1
CHA.7.524-M1
CHA.7.530-M1
CHA.7.537-M1
CHA.7.538-M1
CHA.7.543-M1
CHA.7.528-M1
CHA.7.548-M
PVRIG Ab diana (10ug/ml)

FIG. 5A

Anticuerpo (mIgG)	CE_{50} (HEK OE, nM)	HEK OE/par (3.3ug/ml, gMFIr)	Jurkat (3.3ug/ml, gMFIr)
CHA.7.502	40.18	71.99	6.21
CHA.7.503	1.05	260.98	23.59
CHA.7.506	**No unión**	0.76	**No unión**
CHA.7.508	3.30	45.86	6.50
CHA.7.510	92.81	16.32	4.19
CHA.7.512	52.99	5.12	1.47
CHA.7.514	5.31	49.82	7.67
CHA.7.516	0.79	37.90	5.73
CHA.7.518	0.36	42.24	6.58
CHA.7.520	**No unión**	1.01	**No unión**
CHA.7.522	91.44	10.12	2.99
CHA.7.524	0.46	48.33	7.87
CHA.7.525	3.05	41.86	4.30
CHA.7.526	2.99	47.28	3.98
CHA.7.527	**No unión**	0.98	**No unión**
CHA.7.528	7.31	44.88	6.17
CHA.7.530	0.33	51.14	8.04
CHA.7.534	1.87	43.72	5.05
CHA.7.535	3.67	40.44	2.79
CHA.7.537	2.47	36.61	5.53

FIG. 5B

CHA.7.538	0.52	35.80	7.37
CHA.7.543	0.52	49.81	6.73
CHA.7.544	0.76	42.60	5.68
CHA.7.545	0.76	44.31	6.53
CHA.7.546	0.61	43.14	6.42
CHA.7.547	14.37	10.94	1.02
CHA.7.548	0.27	45.26	7.37
CHA.7.549	2.60	29.71	2.23
CHA.7.550	1.34	27.72	2.10

FIG. 6A

Anticuerpo (mIgG)	NK CD56 int. humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Expi cyno OE/par (gMFIr, 3.3ug/ml)	Células NK cyno (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ cyno (gMFIr, 10ug/ml)
CHA.7.502	1.97	1.41	60.49	No ensayado	No ensayado
CHA.7.503	3.15	1.96	106.3	No ensayado	No ensayado
CHA.7.506	No ensayado	No ensayado	0.77	No ensayado	No ensayado
CHA.7.508	3.6	4.09	41.49	No ensayado	No ensayado
CHA.7.510	3.13	2.73	38.21	No ensayado	No ensayado
CHA.7.512	1.30	1.15	8.96	No ensayado	No ensayado
CHA.7.514	4.16	5.15	65.20	No ensayado	No ensayado
CHA.7.516	4.22	4.09	60.05	1.76	2.09
CHA.7.518	5.08	6.69	83.51	1.92	2.09
CHA.7.520	1.13	1.04	No ensayado	No ensayado	No ensayado
CHA.7.522	2.06	1.90	27.24	No ensayado	No ensayado

FIG. 6B

CHA.7.524	5.50	6.12	66.32	1.78	2.02
CHA.7.525	1.98	1.76	0.85	No ensayado	No ensayado
CHA.7.526	2.08	1.71	0.79	No ensayado	No ensayado
CHA.7.527	1.16	0.99	No ensayado	No ensayado	No ensayado
CHA.7.528	3.08	3.63	12.2	1.21	1.18
CHA.7.530	6.04	6.47	60.80	1.73	1.89
CHA.7.534	2.60	1.96	46.27	No ensayado	No ensayado
CHA.7.535	2.24	1.28	0.82	No ensayado	No ensayado
CHA.7.537	3.90	3.41	1.55	1.18	1.19
CHA.7.538	6.49	6.17	15.16	1.36	1.45
CHA.7.543	4.48	4.33	0.83	1.35	1.39
CHA.7.544	2.36	2.54	61.09	No ensayado	No ensayado
CHA.7.545	2.54	2.82	0.91	No ensayado	No ensayado
CHA.7.546	2.75	2.95	0.85	No ensayado	No ensayado
CHA.7.547	2.21	1.13	26.65	No ensayado	No ensayado
CHA.7.548	3.15	3.35	4.25	1.18	1.09
CHA.7.549	3.05	1.42	1.00	No ensayado	No ensayado
CHA.7.550	1.60	1.29	0.90	No ensayado	No ensayado

FIG. 7A

Anticuerpo (mIgG)	CI_{50} (nM)
CHA.7.502	39.90
CHA.7.503	No CI_{50}
CHA.7.506	31.65
CHA.7.508	37.88
CHA.7.510	55.00
CHA.7.512	839.6
CHA.7.514	38.88
CHA.7.516	33.11
CHA.7.518	23.15
CHA.7.520	619.3
CHA.7.522	50.48
CHA.7.524	30.20
CHA.7.525	85.52
CHA.7.526	58.88
CHA.7.527	No CI_{50}
CHA.7.528	28.88
CHA.7.530	34.56
CHA.7.534	181.4
CHA.7.535	821.1
CHA.7.537	38.95
CHA.7.538	51.87
CHA.7.543	No CI_{50}

FIG. 7B

CHA.7.544	No CI_{50}
CHA.7.545	96.06
CHA.7.546	92.05
CHA.7.547	27.94
CHA.7.548	18.98
CHA.7.549	36.12
CHA.7.550	58.34

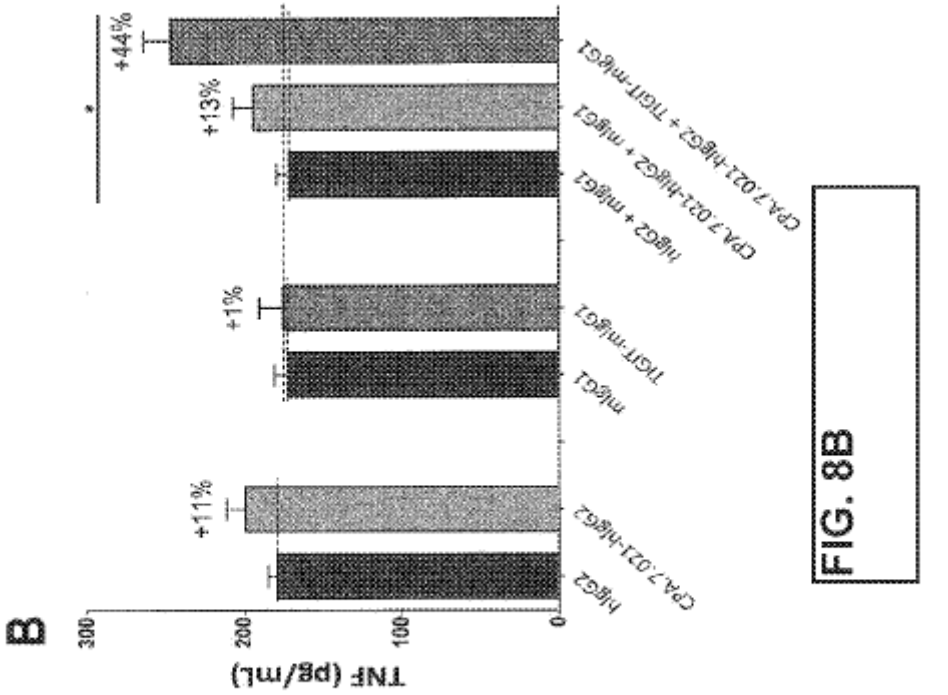


FIG. 8B

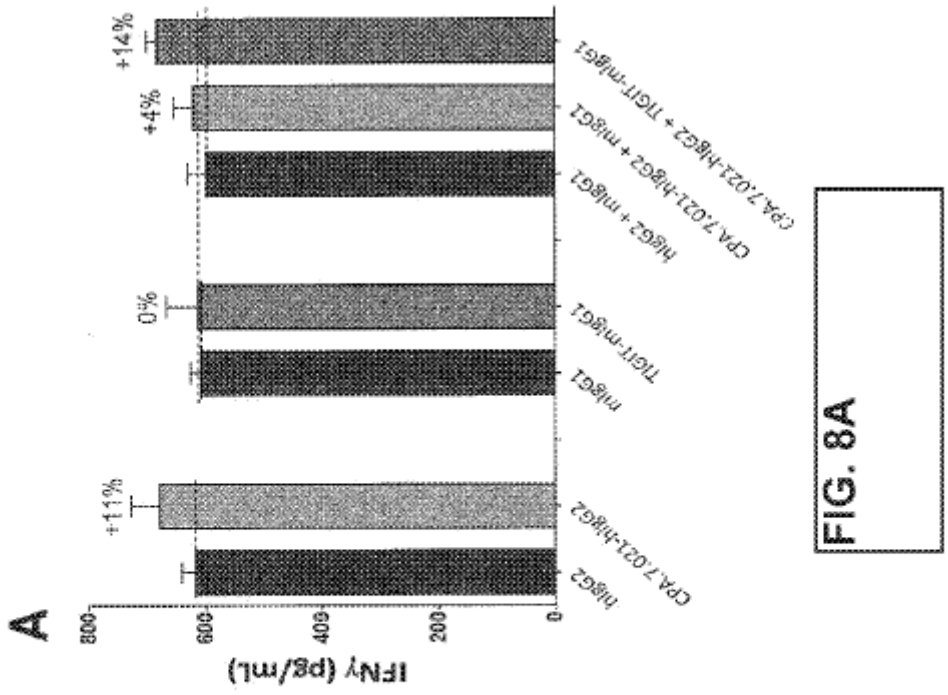


FIG. 8A

TIL 209

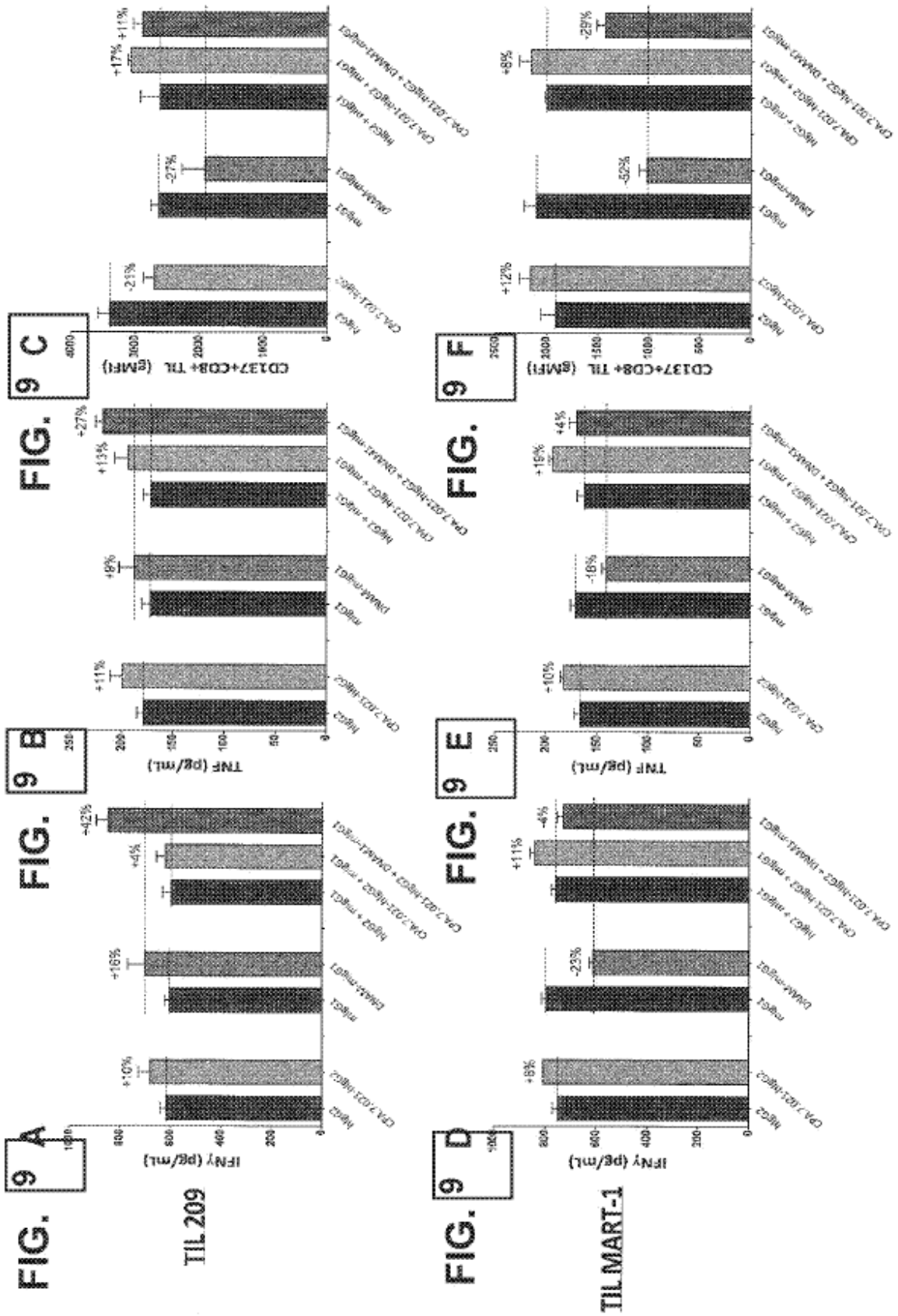


FIG. 9 A
IFNγ (pg/mL)
TIL 209
FIG. 9 B
TNF (pg/mL)
FIG. 9 C
CD137+CD8+ TIL (gMFI)
FIG. 9 D
IFNγ (pg/mL)
TIL MART-1
FIG. 9 E
TNF (pg/mL)
FIG. 9 F
CD137+CD8+ TIL (gMFI)

FIG. 10B

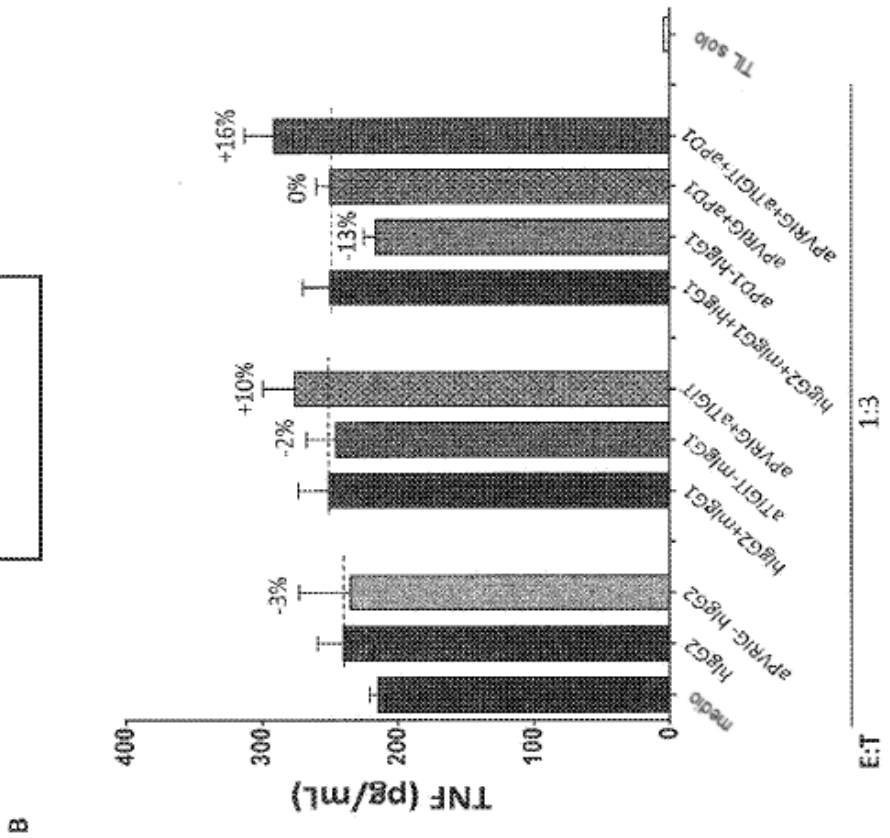


FIG. 10A

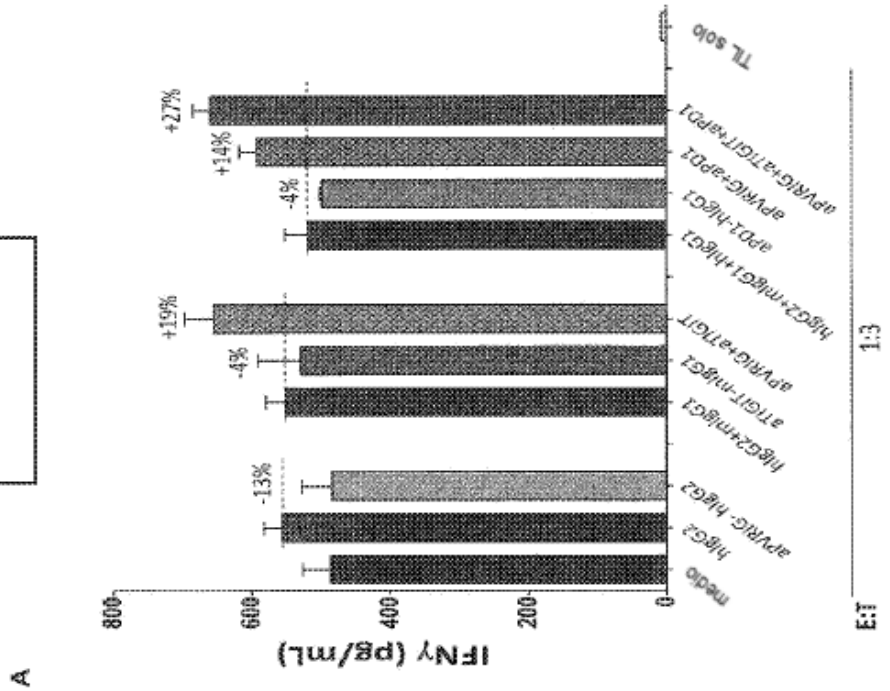


FIG. 11A

Secuencia humanizada de VH del anticuerpo CHA.7.518

Secuencia humanizada potencial basada en marco aceptor IMGT IGHV1-46*01 (definiciones de CDR AbM)

```
IGHV1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
(SEQ ID NO: 25 )
```

Región de unión IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)

```
seq              10          20          30          40          50          60          70          80          90
AbM              10          20          30          40          50  a        60          70          80  abc       90
           b b b     p     p b b b   b b     b  bi i      i ibb  b           i  b   b b b x   b b b  b     bibibb
518       EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTDYNIN WVKQSHGKSLEWIG YIYPYIGGSG YNQKFKSKATLSADNPSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR
           *    *    * **      *                 * ** **    *             *   **** *** ***   *     *  *    *
1-46*01   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H1    QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWMG YIYPYIGGSG YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H2    QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWIG YIYPYIGGSG YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H3    QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWIG YIYPYIGGSG YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H4    QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWIG YIYPYIGGSG YAQKFQGRATLTADNSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
                      V                      #                             N
```

```
seq     100        110        120
AbM                       110
                   i    b b b
518       EDKTARNAMDY WGQGTPVTVSS (SEQ ID NO: 27 )
                          *        (1-46*01 descrita como SEQ ID NO: 28 )
h518H1    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29 )
h518H2    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30 )
h518H3    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31 )
h518H4    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 32 )
                #
```

sustituciones de desamidación : Q/S/A

FIG. 11B

Secuencia humanizada de VL del anticuerpo CHA.7.518

Secuencia humanizada potencial basada en marco aceptor IMGT IGKV1-39*01:k

```
IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO: 33)
```

Región de unión ion IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 34)

```
seq                 10        20        30        40        50        60        70        80
AbM                 10        20        30        40        50        60        70        80
            b b b    p p     p b b  b   b   bi bi i    ii ibbi      i   b   b        b b b  b    ib bib
518        DIQMTQSPASLSVSVGETVTIIC RVSENIYSNLA WYQQKQGKSPQLLVY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC
                   *   *   **   *                   *  * *  *                      *** * *   *   **
IGKV1-39   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h518L1     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RVSENIYSNLA WYQQKPGKAPKLLIY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h518L2     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RVSENIYSNLA WYQQKPGKAPKLLIY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC
h518L3     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RVSENIYSNLA WYQQKPGKAPKLLVY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYC
                       V                 #   #           S          #

seq        90        100
AbM        90        100
           ibi  iib  i   b b b
518        QHFWGTPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 35   )
                       *
IGKV1-39   QQSYSTPP (SEQ ID NO: 36   )
h518L1     QHFWGTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 37   )
h518L2     QHFWGTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 38   )
h518L3     QHFWGTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 39   )
              @
```

sustituciones de desamidación : Q/S/A/D

@ sustituciones de oxidación de triptófano : Y/F/H

FIG. 11C

Secuencias humanizadas de VH del anticuerpo CHA.7.538_1

Secuencia humanizada potencial basada en marco aceptor IMGT IGHV1-46*01

IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: **40**)

Región de unión IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: **41**)

```
seq              10        20         30         40         50          60         70         80       90
AbM              10        20         30         40         50  a       60         70         80  abc    90
             b b b    p     p b b b   b b     b  bi i     i ibb  b          i  b    b b b x     b b b  b      bibibb
538_1     QVQLQQSGAELVRPGASVKVSCKTS GYAFTNYLIE WVKQRPGQGLEWIG VINPGSGGIY YNDKFKVKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
              *     ***          *               * *        *               **   **** * * * *   *   *     * * *   *
1-46*01   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWMG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H2   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H3   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H4   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
                           V                  #                         #           N      T                           F

seq       100         110
AbM                          110
                      i   b b b
538_1     SETHDTWFAY WGQGTLVTVSA  (SEQ ID NO: 42  )
                              *  (1-46*01 descrita como SEQ ID NO:43    )
h5381H1   SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS  (SEQ ID NO: 44  )
h5381H2   SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS  (SEQ ID NO: 45  )
h5381H3   SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS  (SEQ ID NO: 46  )
h5381H4   SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS  (SEQ ID NO: 47  )
               @
```

\# sustituciones de desamidación : Q/S/A

@ sustituciones de oxidación de triptófano : Y/F/H

FIG. 11D

Secuencias humanizadas de VL del anticuerpo CHA.7.538_1

Secuencia humanizada potencial basada en marco aceptor IMGT IGKV1-39*01

IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO: **48**)

Región de unión IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:**49**)

IGKV1-17*02
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLQHNSYPP (SEQ ID NO: **50**)

```
seq              10        20          30          40          50          60         70         80
AbM              10        20          30          40          50          60         70         80
           b b b    p p      p b b  b   b   bi bi i     ii ibbi       i   b   b        b b b  b    ib bib
538        DIVMTQSQKFISTSVGDRVSITC KASQSVRIAVA WFQQKPGQSPKALIY LASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC
             *    **** *        *                *      **  *                 *   *               ** *   * * *
IGKV1-39   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h538L1     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQSVRIAVA WYQQKPGKAPKLLIY LASTRHT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h538L2     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQSVRIAVA WFQQKPGKAPKALIY LASTRHT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYC
                     I T                               S                                              L   F

seq        90        100
AbM        90        100
           ibi  iib  i   b b b
538        LQHWNYPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 51    )
                       *
IGKV1-39   QQSYSTPP (SEQ ID NO: 52    )
h538L1     LQHWNYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 53    )
h538L2     LQHWNYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 54    )
              @#
```

\# sustituciones de desamidación : Q/S/A/D

@ sustituciones de oxidación de triptófano : Y/F/H

FIG. 11E

Secuencias humanizadas de VH del anticuerpo CHA.7.538_2

Secuencia humanizada potencial basada en marco aceptor IMGT IGHV1-46*01

IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:**55**)

Región de unión
IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: **56**)

```
seq              10        20          30         40          50          60        70        80        90
AbM              10        20          30         40          50  a       60         70        80  abc     90
          b b b     p     p b b b   b b     b  bi i     i ibb  b           i  b   b b b x   b b b  b     bibibb
538_2     QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAA GYTFTNYWIG WVKQRPGHGLEWIG DIYPGGGYTN YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCAS
               *     ***  *   *   *                * *  *    *           **  * ** * *    *  *  *     *  * *    *
1-46*01   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5382H1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWMG DIYPGGGYTN YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5382H2   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWIG DIYPGGGYTN YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAS
h5382H3   QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWIG DIYPGGGYTN YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS
                      V                 # @                          #  N                                  I

seq       100          110
AbM                          110
                      i   b b b
538_2     PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:57   )
                                * (1-46*01 descrita como SEQ ID NO:58    )
h5382H1   PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:59   )
h5382H2   PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60   )
h5382H3   PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:61   )
```

\# sustituciones de desamidación : Q/S/A

@ sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

Figura 12A

Qué	Secuencias
CHA.7.518 VH humanizado h518HH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:62)**
CHA.7.518 VH humanizado h518HH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQG RVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:63)**
CHA.7.518 VH humanizado h518HH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQG RATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:64)**
CHA.7.518 VH humanizado h518HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQGR ATLTADNSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:65)**
CHA.7.518 VL humanizado h518HL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:66)**
CHA.7.518 VL humanizado h518HL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:67)**
CHA.7.518 VL humanizado h518HL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYEATNLAEGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:68)**

ES 2 774 320 T3

Figura 12B

Qué	Secuencias
CHA.7.538_1 VH humanizado h5381HH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVINPGSGGIYYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:69)**
CHA.7.538_1 VH humanizado h5381HH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQG RVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:70)**
CHA.7.538_1 VH humanizado h5381HH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQG RVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:71)**
CHA.7.538_1 VH humanizado h5381HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQG RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:72)**
CHA.7.538_1/538_2 VL humanizado h538HL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWYQQKPGKAPKLLIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:73)**
CHA.7.538_1/538_2 VL humanizado h538HL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSVQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:74)**

Figura 12C

Qué	Secuencias
CHA.7.538_2 VH humanizado h5382HH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGGYTNYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:75)**
CHA.7.538_2 VH humanizado h5382HH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYAQKFQ GRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:76)**
CHA.7.538_2 VH humanizado h5382HH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYAQKFQ GRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:77)**
CHA.7.538_1/538_2 VL humanizado h538HL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWYQQKPGKAPKLLIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:78)**
CHA.7.538_1/538_2 VL humanizado h538HL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSVQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:79)**

Figura 13 parejas de VH - VL de CHA.7 humanizadas

Anticuerpo CHA.7.518	VH	VL
ch518	VHquim	VLquim
h518-1	h518HH1	h518HL1 (opcional)
h518-2	h518HH2	h518HL2
h518-3	h518HH3	h518HL2
h518-4	h518HH3	h518HL3
h518-5	h518HH4	h518HL3

Anticuerpo CHA.7.538_1	VH	VL
ch538.1	VHquim	VLquim
h538.1-1	h538.1HH1	h538.1HL1 (opcional)
h538.1-2	h538.1HH2	h538.1HL2
h538.1-3	h538.1HH3	h538.1HL2
h538.1-4	h538.1HH4	h538.1HL2

Anticuerpo CHA.7.538_2	VH	VL
ch538.2	VHquim	VLquim
h538.2-1	h538.2HH1	h538.1HL1 (opcional)
h538.2-2	h538.2HH2	h538.1HL2
h538.2-3	h538.2HH3	h538.1HL2

FIG. 14

Anticuerpo (mIgG)	NK CD56 int. humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Expi cyno OE/par (gMFIr, 3.3ug/ml)	Células NK cyno (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ cyno (gMFIr, 10ug/ml)
CHA.7.502	1.97	1.41	60.49	No ensayado	No ensayado
CHA.7.503	3.15	1.96	106.3	No ensayado	No ensayado
CHA.7.506	No ensayado	No ensayado	0.77	No ensayado	No ensayado
CHA.7.508	3.6	4.09	41.49	No ensayado	No ensayado
CHA.7.510	3.13	2.73	38.21	No ensayado	No ensayado
CHA.7.512	1.30	1.15	8.96	No ensayado	No ensayado
CHA.7.514	4.16	5.15	65.20	No ensayado	No ensayado
CHA.7.516	4.22	4.09	60.05	1.76	2.09
CHA.7.518	5.08	6.69	83.51	1.92	2.09
CHA.7.520	1.13	1.04	No ensayado	No ensayado	No ensayado
CHA.7.522	2.06	1.90	27.24	No ensayado	No ensayado
CHA.7.524	5.50	6.12	66.32	1.78	2.02
CHA.7.525	1.98	1.76	0.85	No ensayado	No ensayado
CHA.7.526	2.08	1.71	0.79	No ensayado	No ensayado
CHA.7.527	1.16	0.99	No ensayado	No ensayado	No ensayado
CHA.7.528	3.08	3.63	12.2	1.21	1.18
CHA.7.530	6.04	6.47	60.80	1.73	1.89
CHA.7.534	2.60	1.96	46.27	No ensayado	No ensayado
CHA.7.535	2.24	1.28	0.82	No ensayado	No ensayado
CHA.7.537	3.90	3.41	1.55	1.18	1.19
CHA.7.538	6.49	6.17	15.16	1.36	1.45
CHA.7.543	4.48	4.33	0.83	1.35	1.39
CHA.7.544	2.36	2.54	61.09	No ensayado	No ensayado
CHA.7.545	2.54	2.82	0.91	No ensayado	No ensayado
CHA.7.546	2.75	2.95	0.85	No ensayado	No ensayado
CHA.7.547	2.21	1.13	26.65	No ensayado	No ensayado
CHA.7.548	3.15	3.35	4.25	1.18	1.09
CHA.7.549	3.05	1.42	1.00	No ensayado	No ensayado
CHA.7.550	1.60	1.29	0.90	No ensayado	No ensayado

FIG. 15

Anticuerpo (mIgG)	CI_{50} (nM)
CHA.7.502	39.90
CHA.7.503	No CI_{50}
CHA.7.506	31.65
CHA.7.508	37.88
CHA.7.510	55.00
CHA.7.512	839.6
CHA.7.514	38.88
CHA.7.516	33.11
CHA.7.518	23.15
CHA.7.520	619.3
CHA.7.522	50.48
CHA.7.524	30.20
CHA.7.525	85.52
CHA.7.526	58.88
CHA.7.527	No CI_{50}
CHA.7.528	28.88
CHA.7.530	34.56
CHA.7.534	181.4
CHA.7.535	821.1
CHA.7.537	38.95
CHA.7.538	51.87
CHA.7.543	No CI_{50}
CHA.7.544	No CI_{50}
CHA.7.545	96.06
CHA.7.546	92.05
CHA.7.547	27.94
CHA.7.548	18.98
CHA.7.549	36.12
CHA.7.550	58.34

FIG. 16

Anticuerpo (hIgG1)	Línea celular diana	Veces de cambio en la citotoxicidad respecto al control
CPA.7.002	Reh	2.9
	MOLM-13	1.9
CPA.7.005	Reh	1.6
	MOLM-13	1.6
CPA.7.021	Reh	1.9
	MOLM-13	0.7
CPA.7.036	Reh	0.9
CPA.7.037	Reh	1.1
CPA.7.038	Reh	0.8
CPA.7.041	Reh	0.7
CPA.7.042	Reh	0.7
CPA.7.050	Reh	1.6
TIGIT	Reh	1.1
	MOLM-13	1.1
DNAM-1	Reh	1.2

FIG. 17

```
NP_076975.2-Homosapiens                 TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQW
XP_005549281.1-Macacafascicularis       TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQW
XP_003732227.1-Callithrixjacchus        TPEVWVQVQMKATELSSFTVHCGFLGSGSISLVTVSWGGPDGAGGTRLAVLHPELGTRQW
XP_001103603.1-Macacamulatta            TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQW
                                        ********:*:******** ;:***** ************;***** ******* * ***

NP_076975.2-Homosapiens                 APARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA
XP_005549281.1-Macacafascicularis       APARQARWETQSSISLALEDSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSA
XP_003732227.1-Callithrixjacchus        APAHQARWETQSSISLVLEEPGASSPSANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA
XP_001103603.1-Macacamulatta            APARQARWETQSSISLALEDSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSA
                                        ***:************** **  ***** ******************;***************

NP_076975.2-Homosapiens                 PPTPAPILRAD
XP_005549281.1-Macacafascicularis       PPTPVPILRAD
XP_003732227.1-Callithrixjacchus        PIL-----RAD
XP_001103603.1-Macacamulatta            PPTPVPILRAD
                                        *   .   ***
```

SEQ ID NOS:80-83, respectivamente en orden de aparición

FIG. 18A

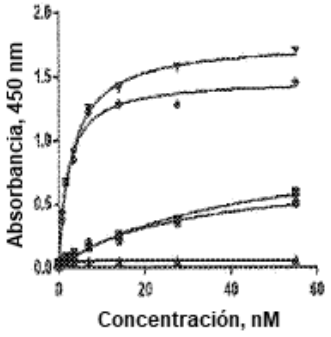


FIG. 18B

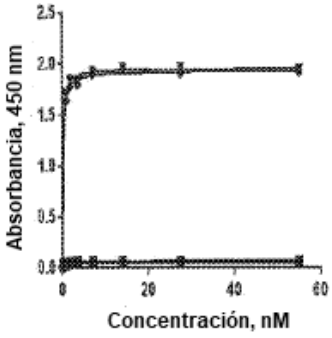
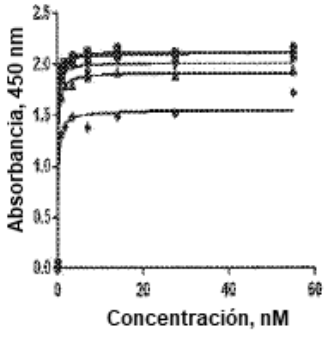


FIG. 18C



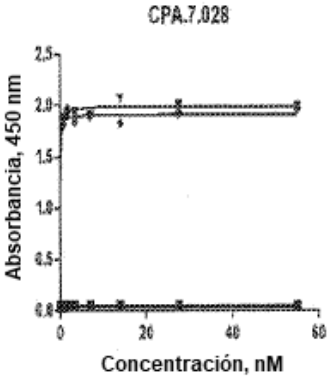


FIG. 18D

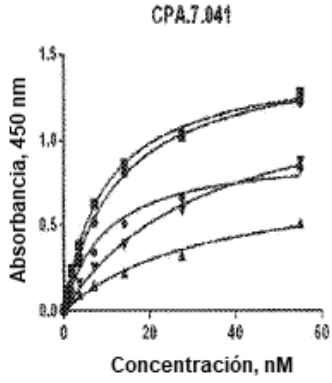


FIG. 18E

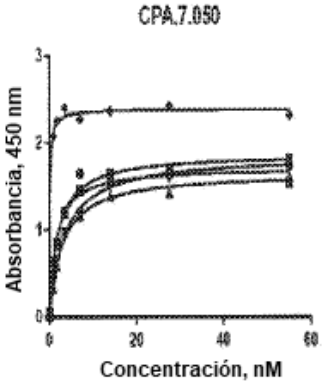


FIG. 18F

FIG. 19

mAb	Reactividad cruzada con cyno	Clase de epítopo	Grupo de epítopo
CPA.7.002	+	1	2
CPA.7.021	-	1	1
CPA.7.024	+++	1	3
CPA.7.028	-	1	1
CPA.7.041	++	1	2
CPA.7.050	+++	4	3

FIG. 20A

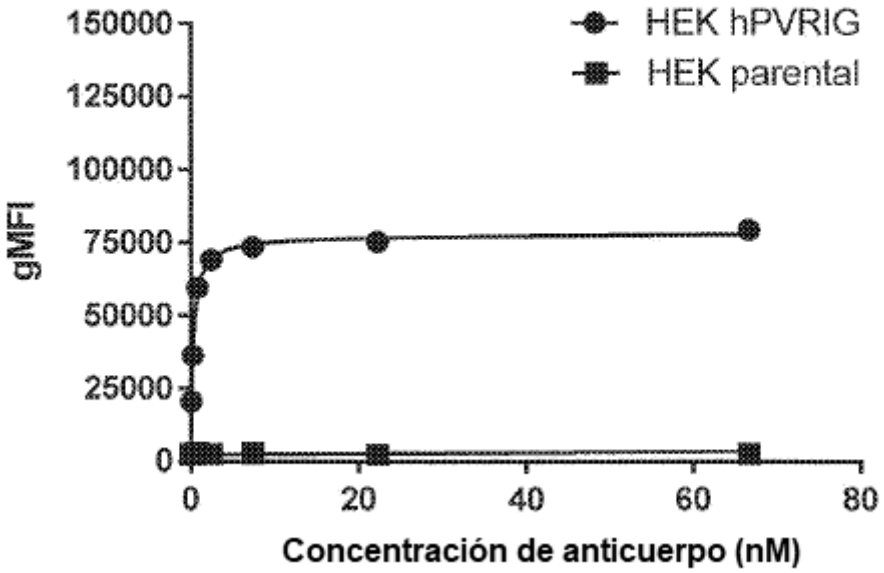


FIG. 20B

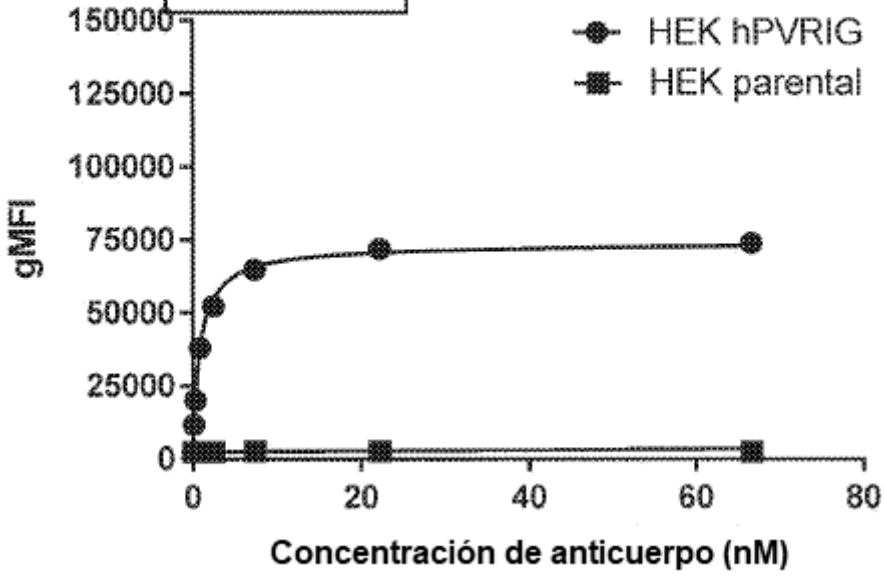


FIG. 21A

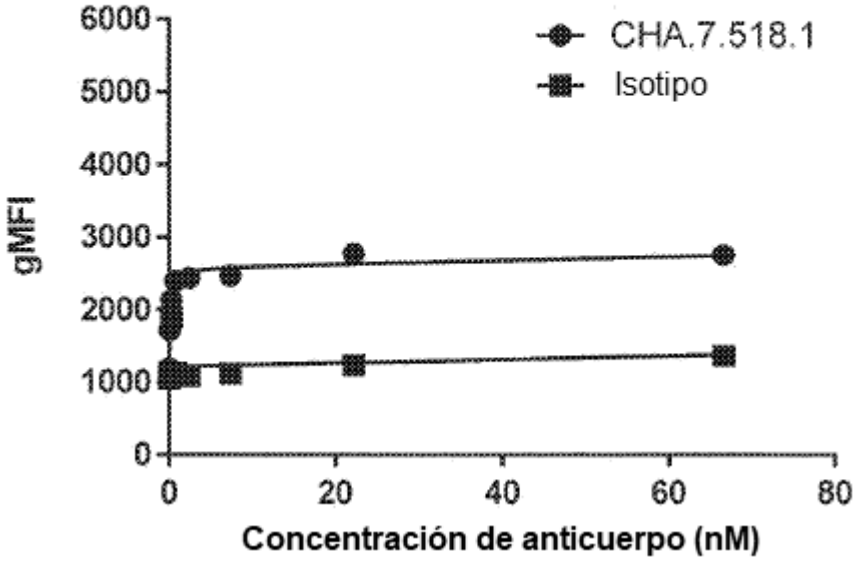


FIG. 21B

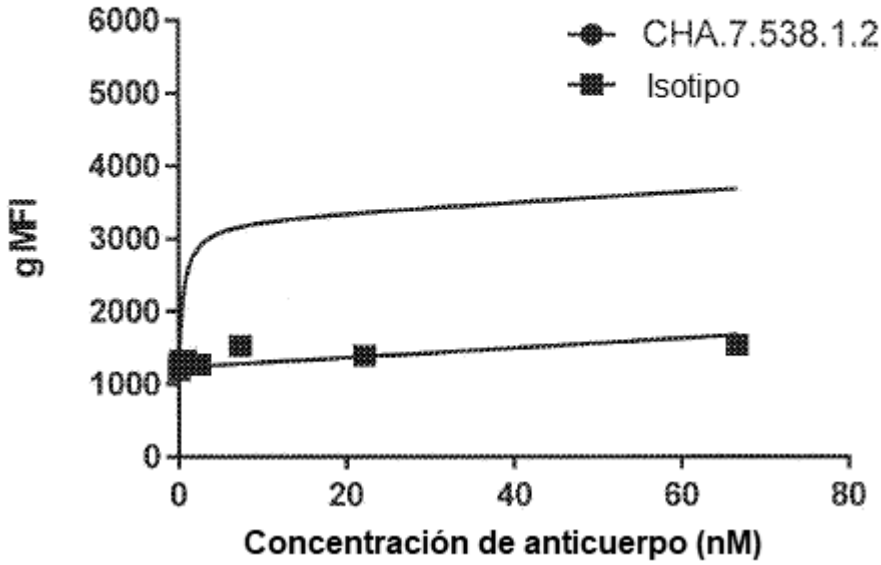


FIG. 22

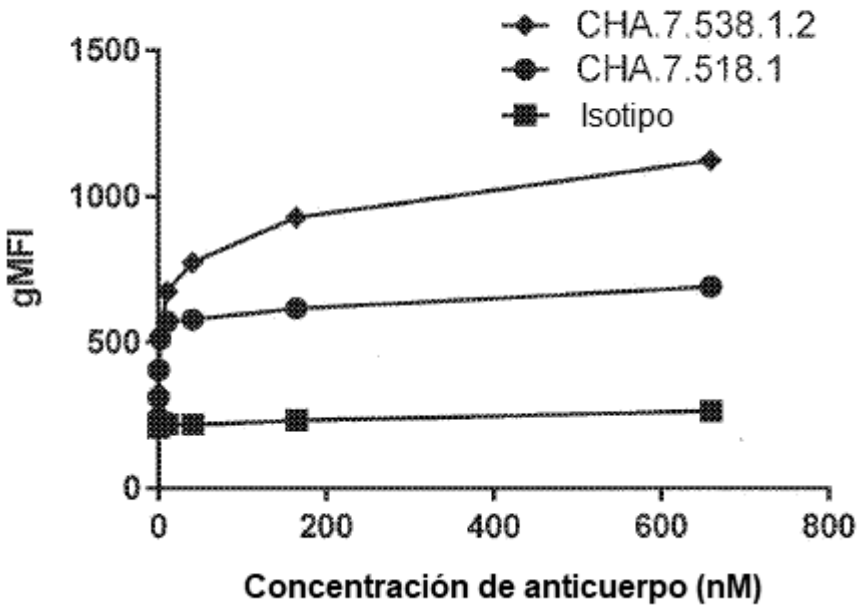

CHA.7.538.1.2
CHA.7.518.1
Isotipo
gMFI
1500
1000
500
0
0
200
400
600
800
Concentración de anticuerpo (nM)

FIG. 23A

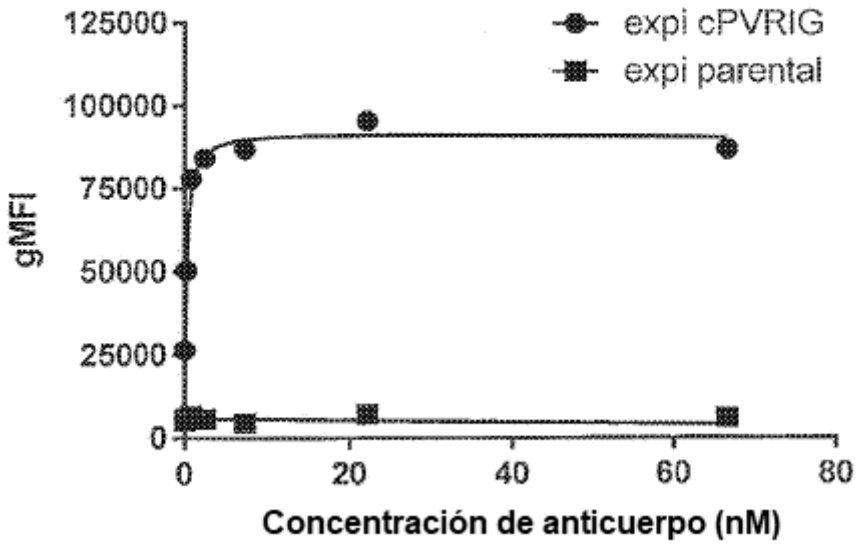


FIG. 23B

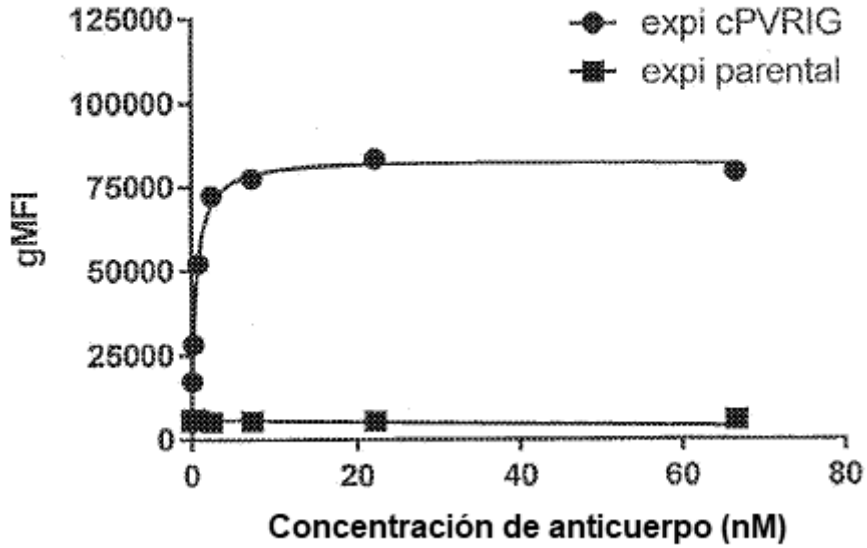


FIG. 24A

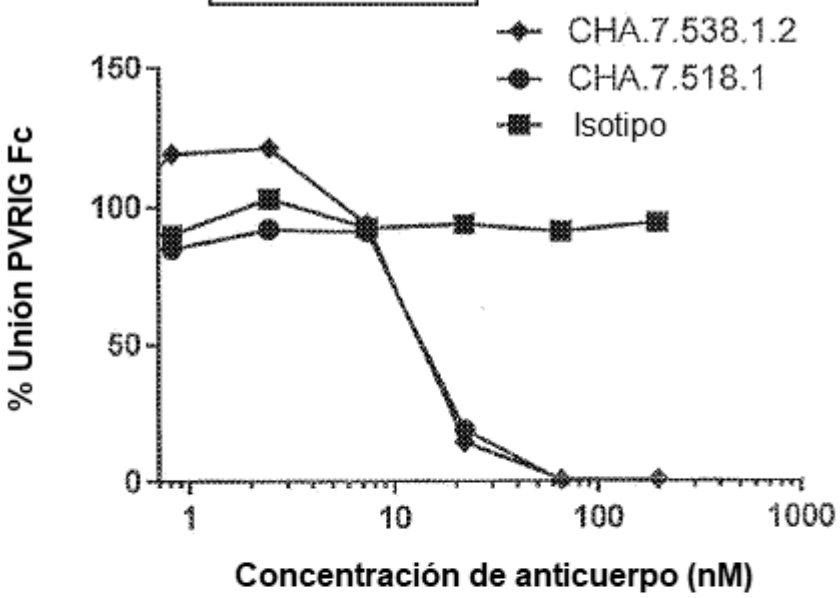


FIG. 24B

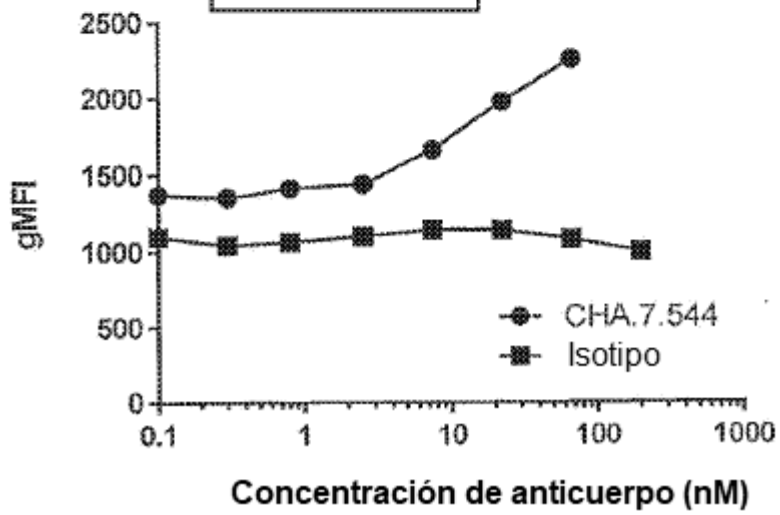


FIG. 25A

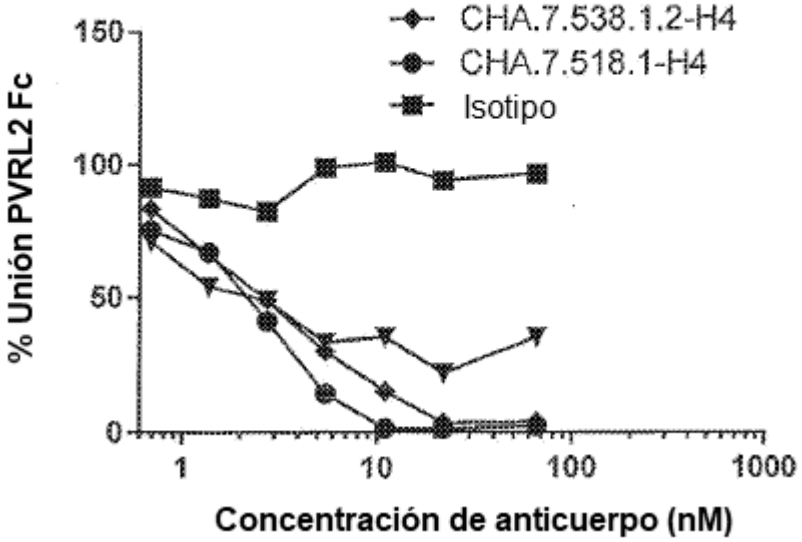


FIG. 25B

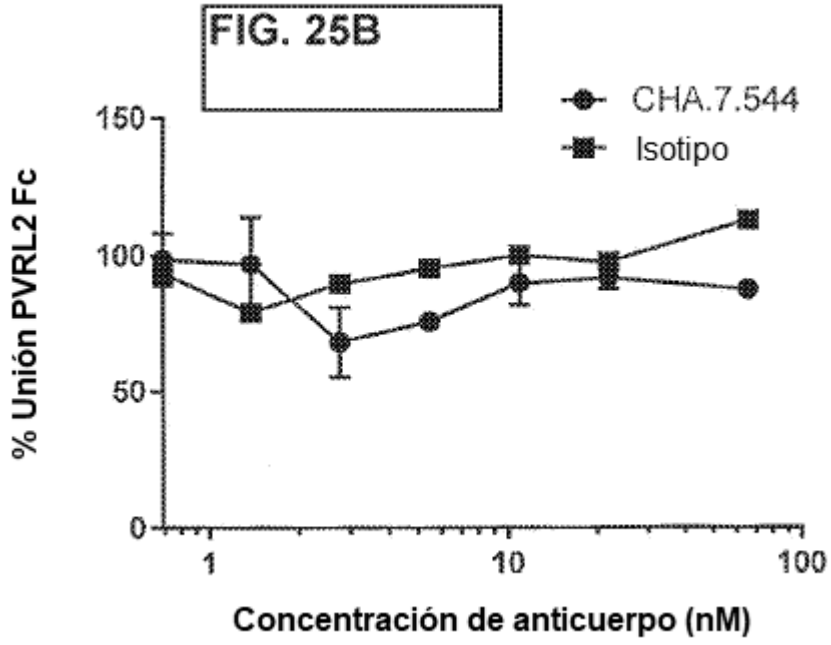


FIG. 26

	CHA.7.518.1 (Alexa 647)	CHA.7.538.1.2 (Alexa 647)
Isotipo (no conjugado)	100	100
CHA.7.518.1 (no conjugado)	14	32
CHA.7.538.1.2 (no conjugado)	7	7

Figura 27A

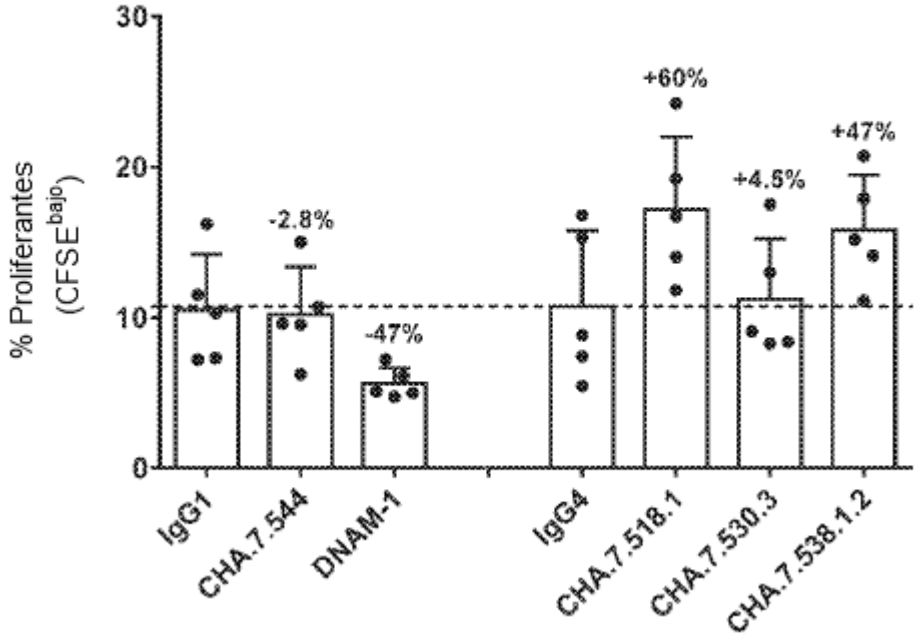


Figura 27B

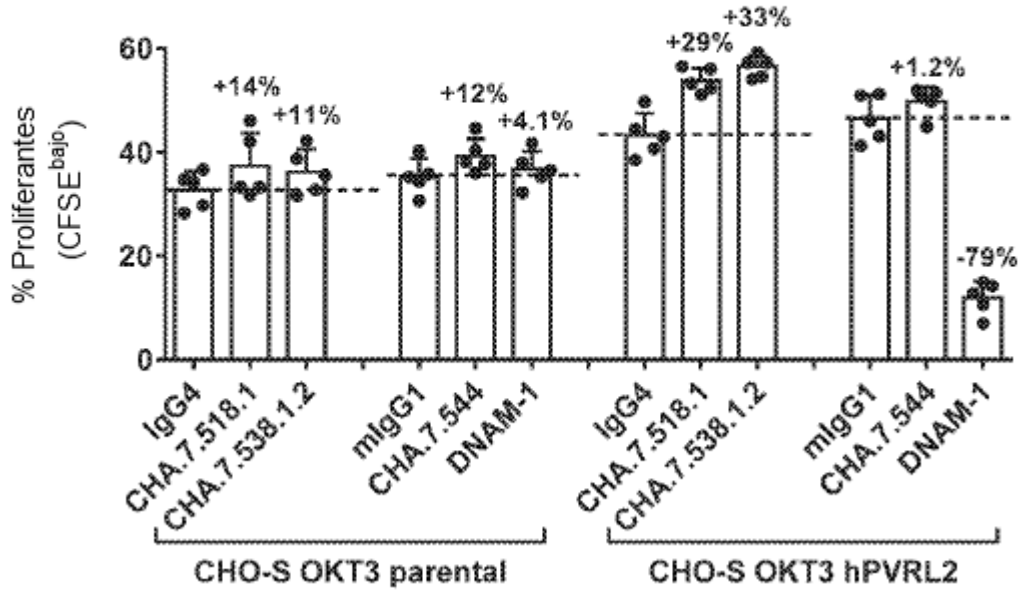


FIG. 28A

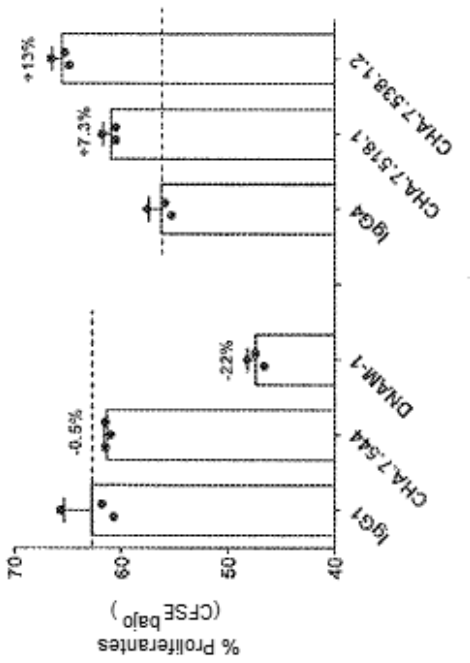


FIG. 28B

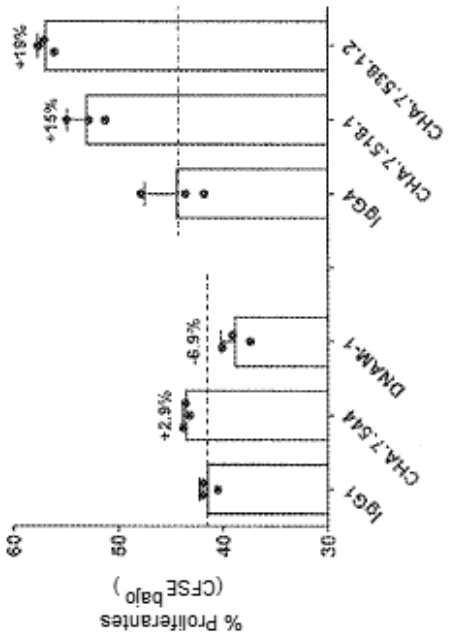
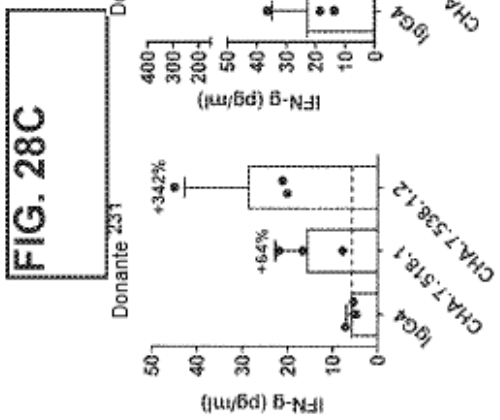
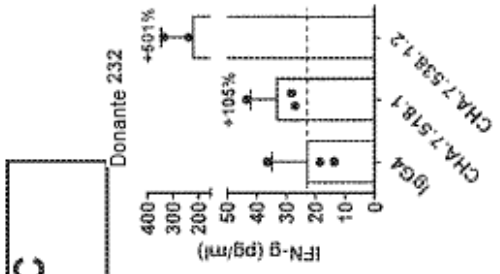


FIG. 28C





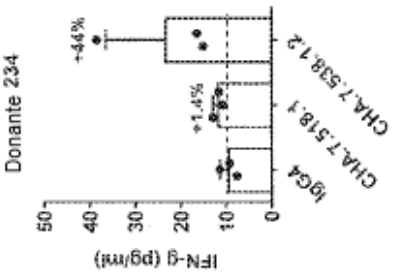


FIG. 29

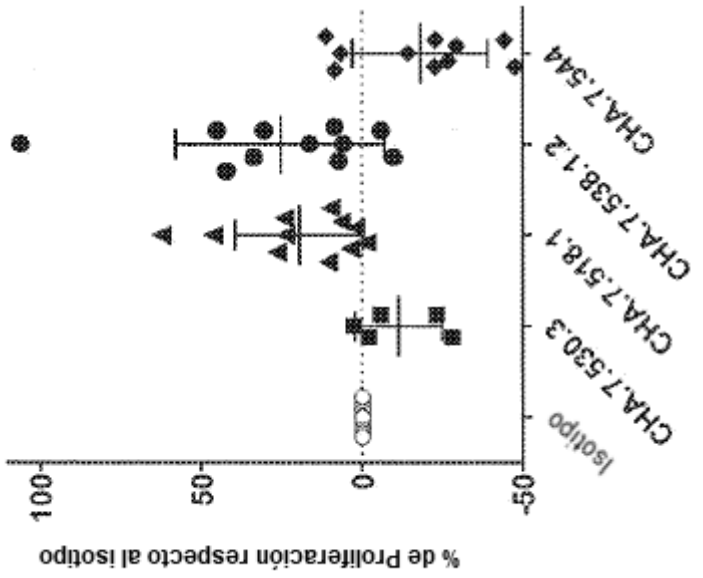

% de Proliferación respecto al isotipo
100
50
0
-50
isotipo
CHA.7.530.3
CHA.7.518.1
CHA.7.538.1.2
CHA.7.544

FIG. 30A

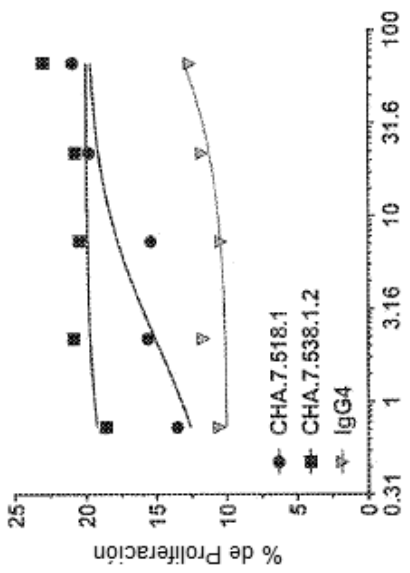


FIG. 30B

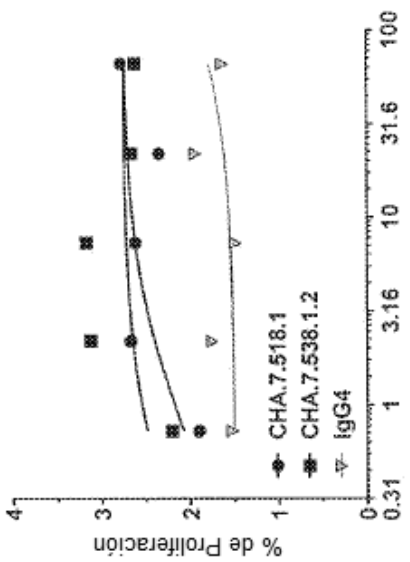


FIG. 30C

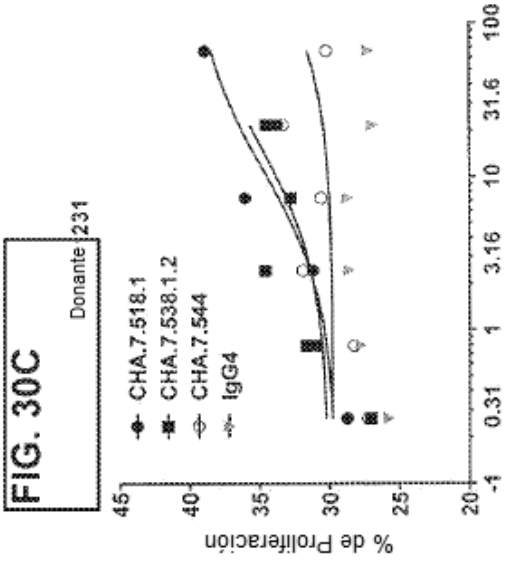


FIG. 30D

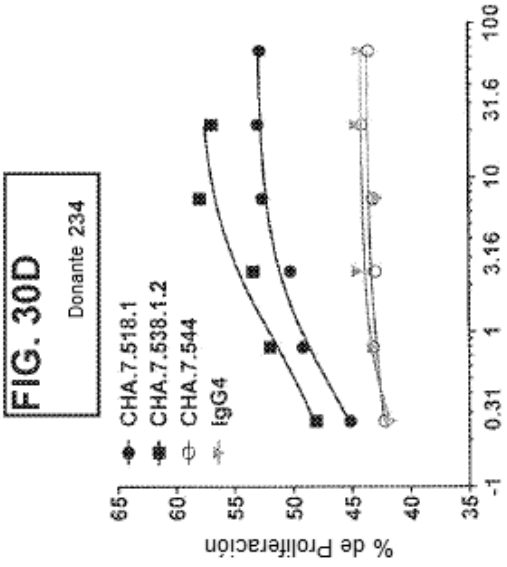


FIG. 31A

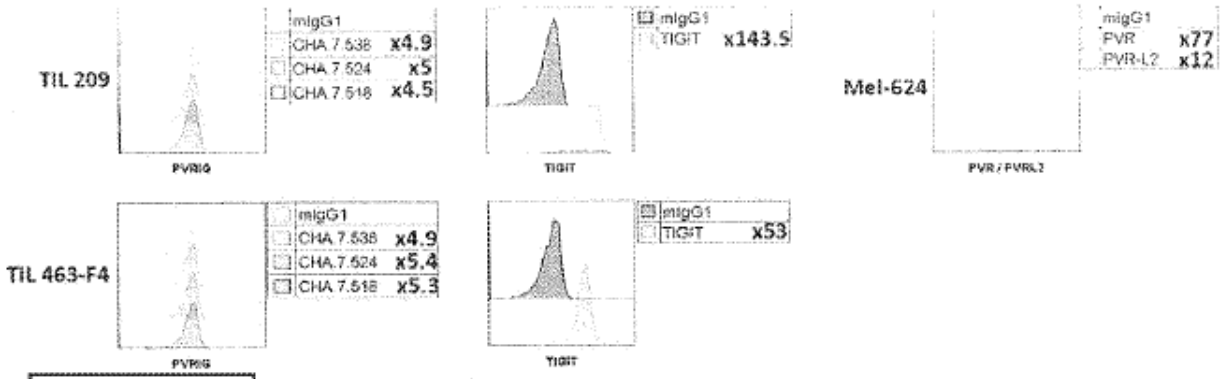
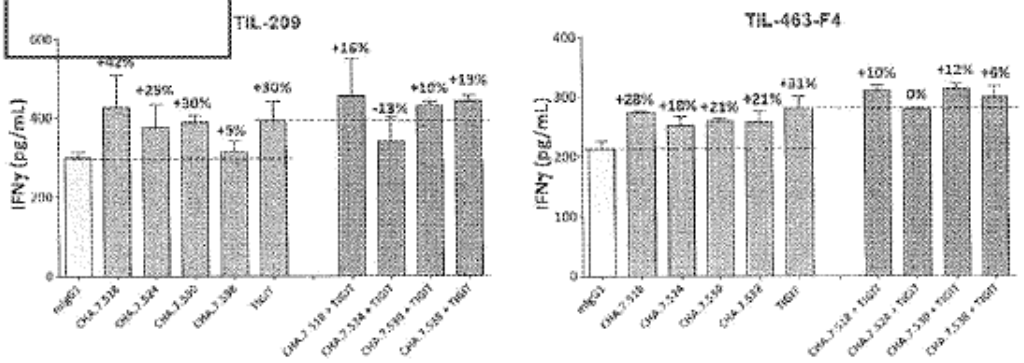


FIG. 31B



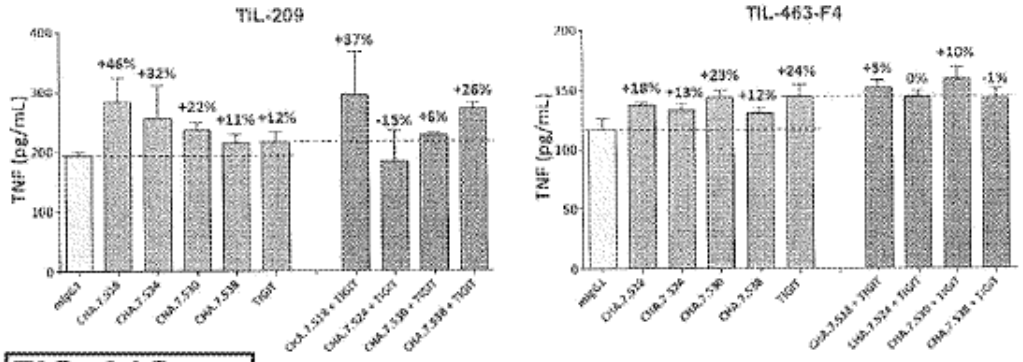


FIG. 31C

FIG. 32A

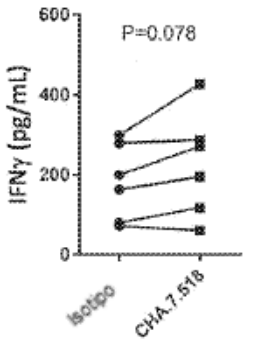


FIG. 32B

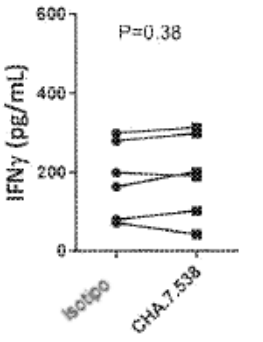


FIG. 32C

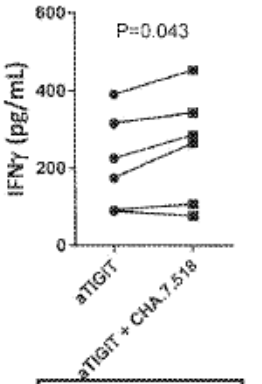


FIG. 32D

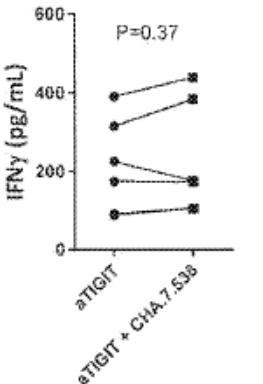


FIG. 32E

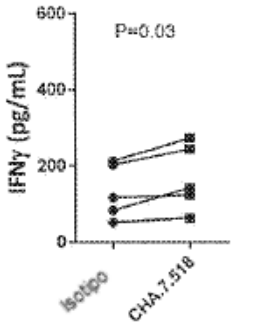


FIG. 32F

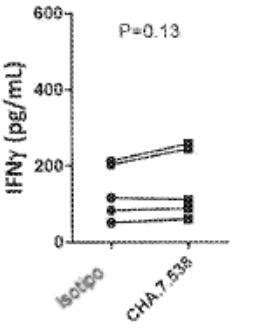


FIG. 32G

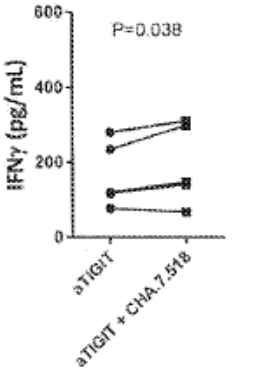


FIG. 32H

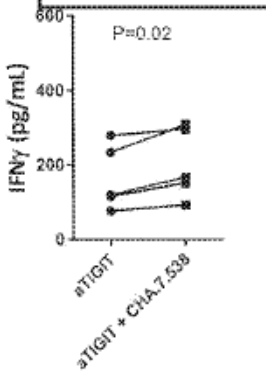


FIG. 33A

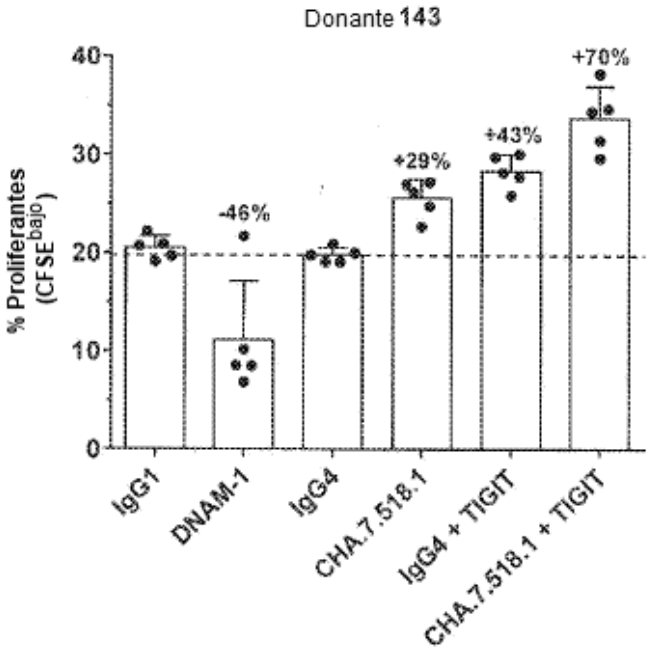


FIG. 33B

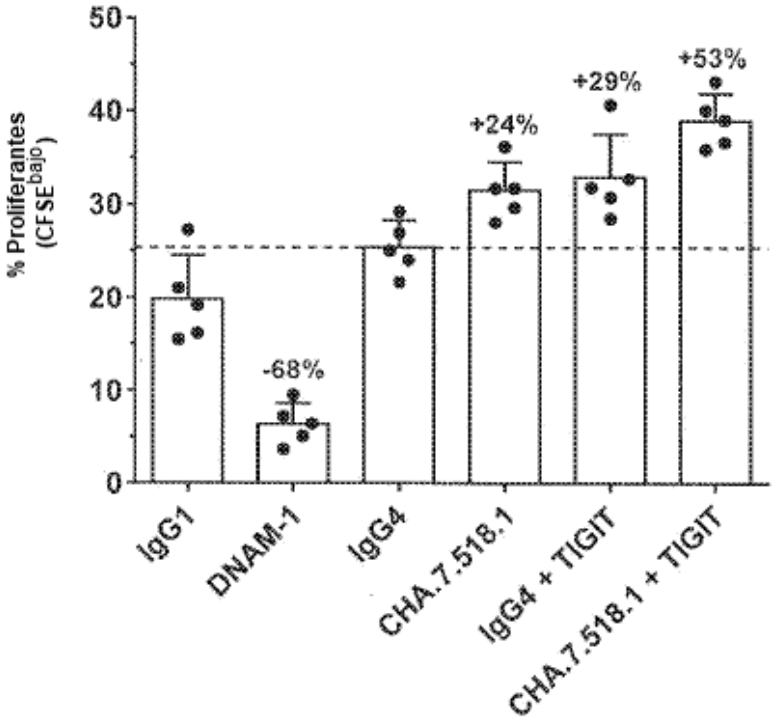


FIG. 34A

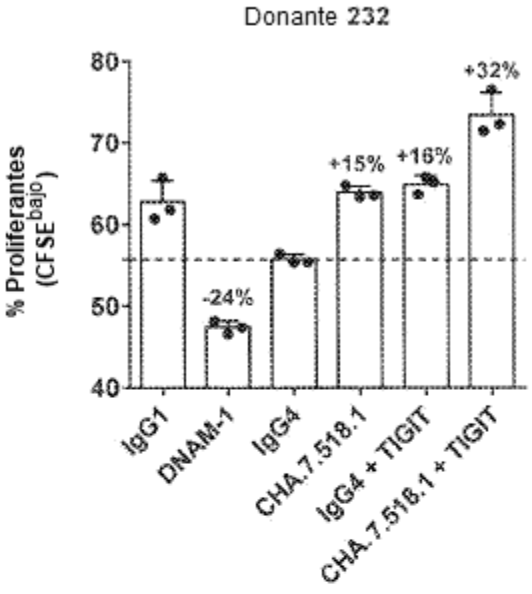


FIG. 34B

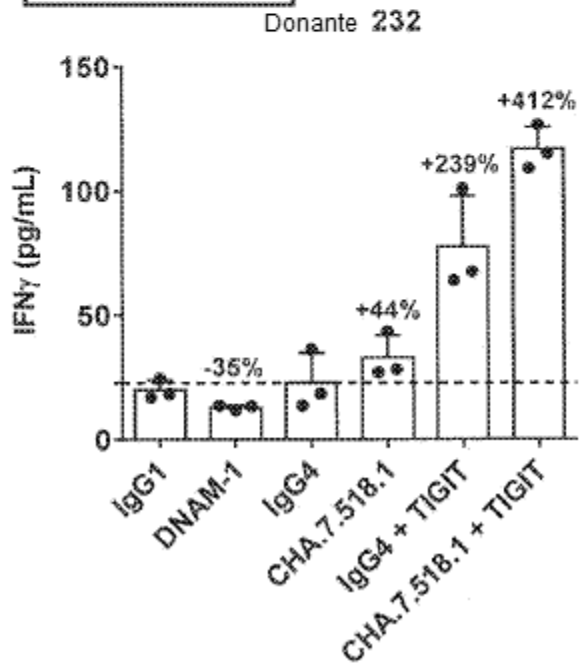


FIG. 35

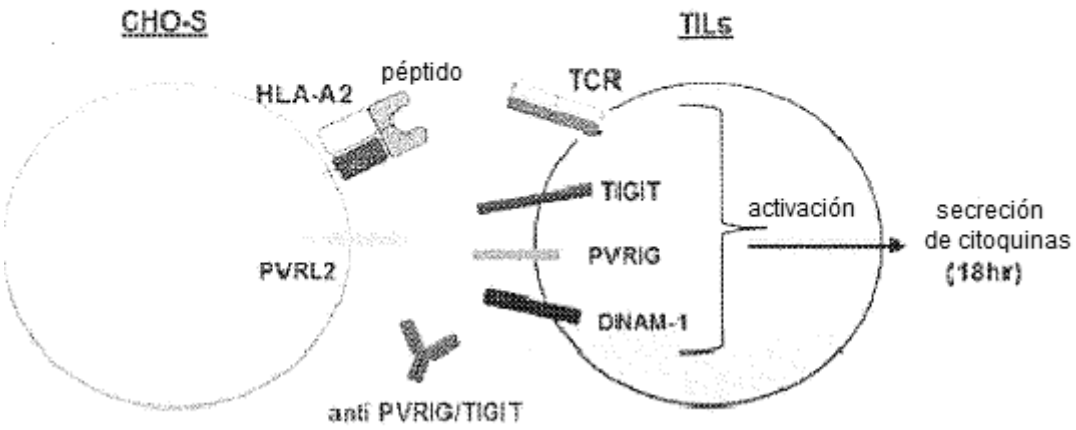
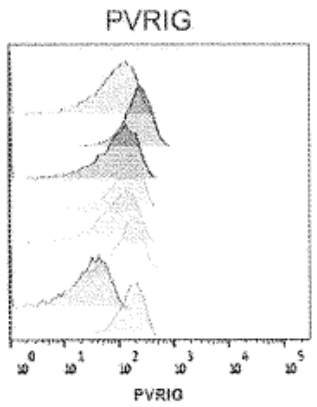
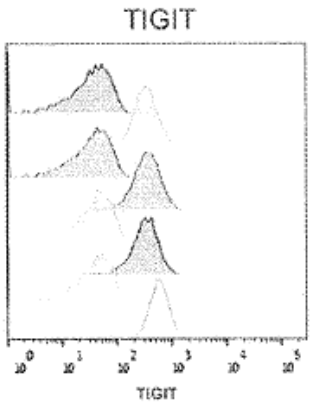

CHO-S
TILs
HLA-A2
péptido
TCR
TIGIT
activación
secreción
de citoquinas
(18hr)
PVRL2
PVRIG
DNAM-1
anti PVRIG/TIGIT

FIG. 36A



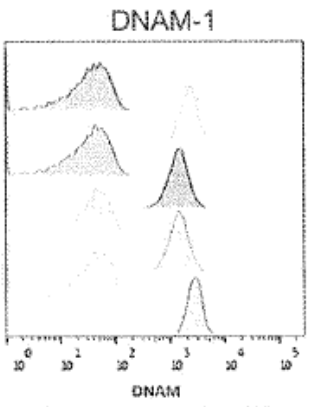
MART1 anti iso control	19.8	9.3veces
MART1 anti PVRIG	184	
F5 anti iso control	20.1	4.2 veces
F5 anti PVRIG	84.3	
F4 anti iso control	21.1	3.9veces
F4 anti PVRIG	82.1	
209 anti iso control	11.0	9.1veces
209 anti PVRIG	101	

FIG. 36B



MART1 anti iso control	12.5	25 veces
MART1 anti TIGIT	320	
F5 anti iso control	11.5	27 veces
F5 anti TIGIT	312	
F4 anti iso control	14.7	18.8veces
F4 anti TIGIT	277	
209 anti iso control	13.5	40 veces
209 anti TIGIT	543	

FIG. 36C



MART1 anti iso control	12.5	166 veces
MART1 anti DNAM	2078	
F5 anti iso control	11.5	113 veces
F5 anti DNAM	1308	
F4 anti iso control	14.7	87 veces
F4 anti DNAM	1291	
209 anti iso control	13.5	189 veces
209 anti DNAM	2557	

FIG. 37

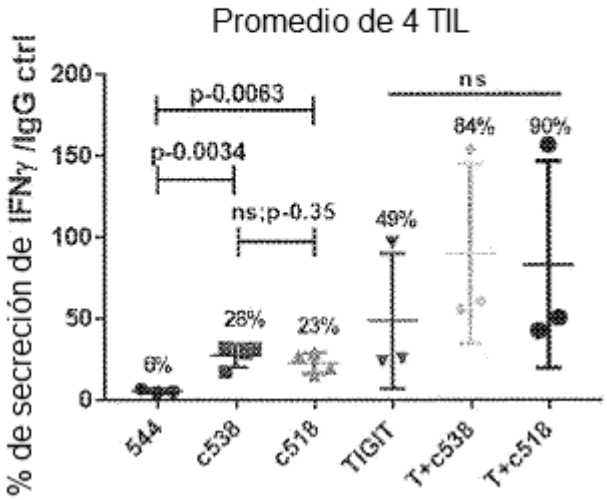

Promedio de 4 TIL
% de secreción de IFNγ /IgG ctrl
200
150
100
50
0
p-0.0063
p-0.0034
ns;p-0.35
ns
6%
28%
23%
49%
84%
90%
544
c538
c518
TIGIT
T+c538
T+c518

FIG. 38A

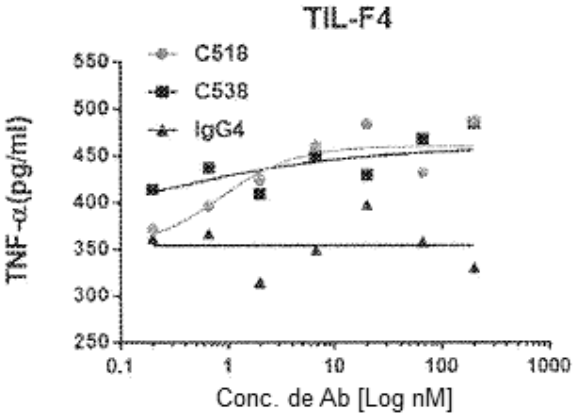


FIG. 38B

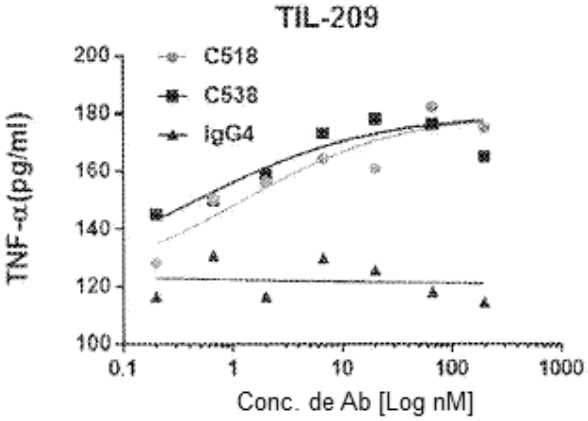


FIG. 39A

péptido 0.5ug/ml		TIGIT	544	c538	c518	TIGIT+c518
TIL-209	IFNγ	111%	11%	29%	29%	171%
	TNFα	181%	17%	20%	23%	216%
TIL-F4	IFNγ	32%	<5%	<5%	11%	47%
	TNFα	63%	<5%	<5%	21%	83%
TIL-F5	IFNγ	37%	15%	39%	56%	86%
	TNFα	44%	5%	<5%	9%	54%

péptido 0.1ug/ml		544	c538	c518
TIL-209	IFNγ	12%	48%	39%
	TNFα	20%	47%	38%
TIL-F4	IFNγ	8%	13%	9%
	TNFα	7%	31%	15%
TIL-F5	IFNγ	3%	31%	21%
	TNFα	0%	10%	14%

FIG. 39B

péptido 0.1ug/ml		544	c538	c518	TIGIT	c538+ TIGIT	c518+ TIGIT
TIL-209	IFNγ	2%	16%	19%	97%	154%	157%
	TNFα	7%	28%	27%	150%	190%	180%
TIL-F4	IFNγ	2%	12%	7%	26%	56%	51%
	TNFα	15%	31%	18%	39%	55%	60%
TIL-F5	IFNγ	8%	4%	10%	24%	61%	43%
	TNFα	11%	16%	20%	35%	56%	59%
MART-1	IFNγ	50%	53%	81%	39%	87%	81%

FIG. 39C

FIG. 40A

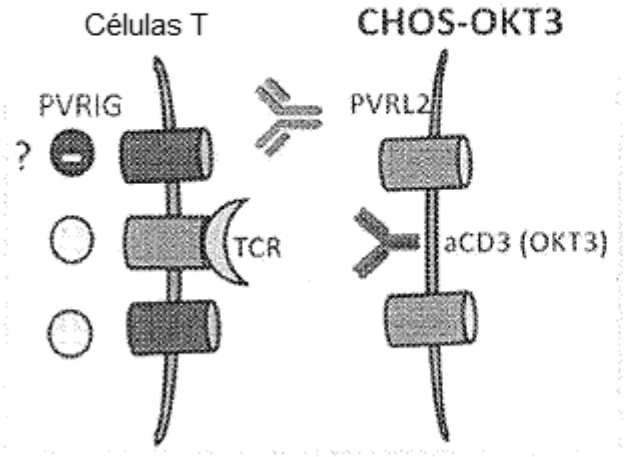


FIG. 40B

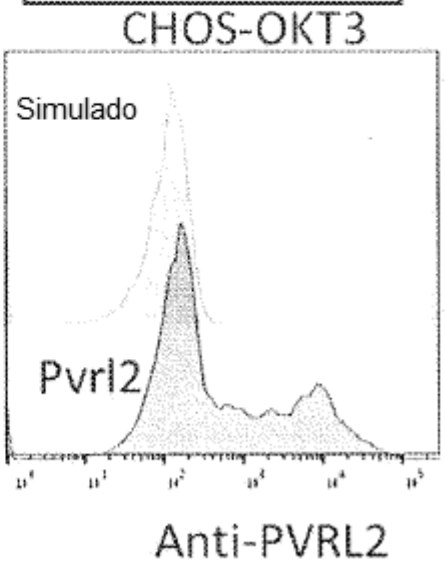


FIG. 41A

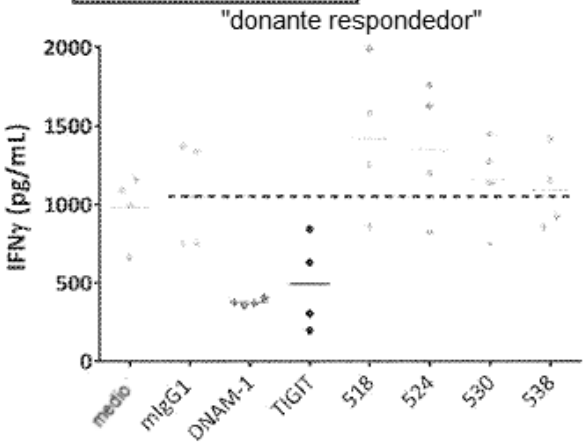
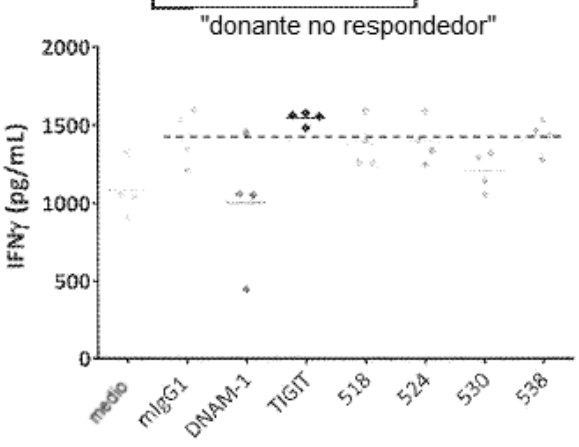


FIG. 41B



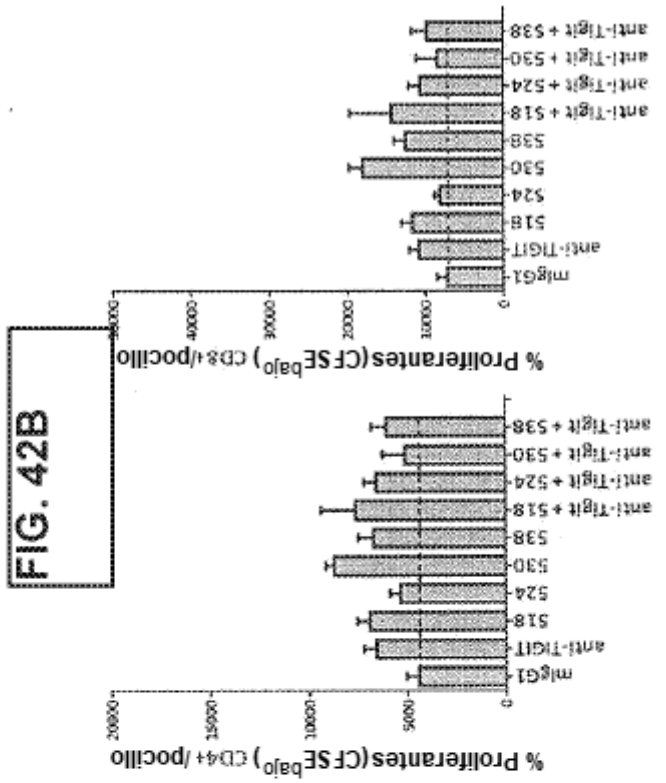


FIG. 42B

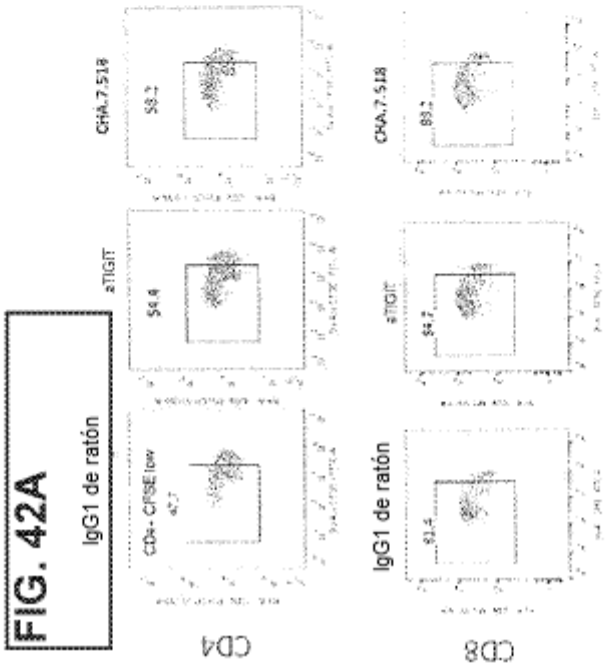


FIG. 42A

FIG. 43A

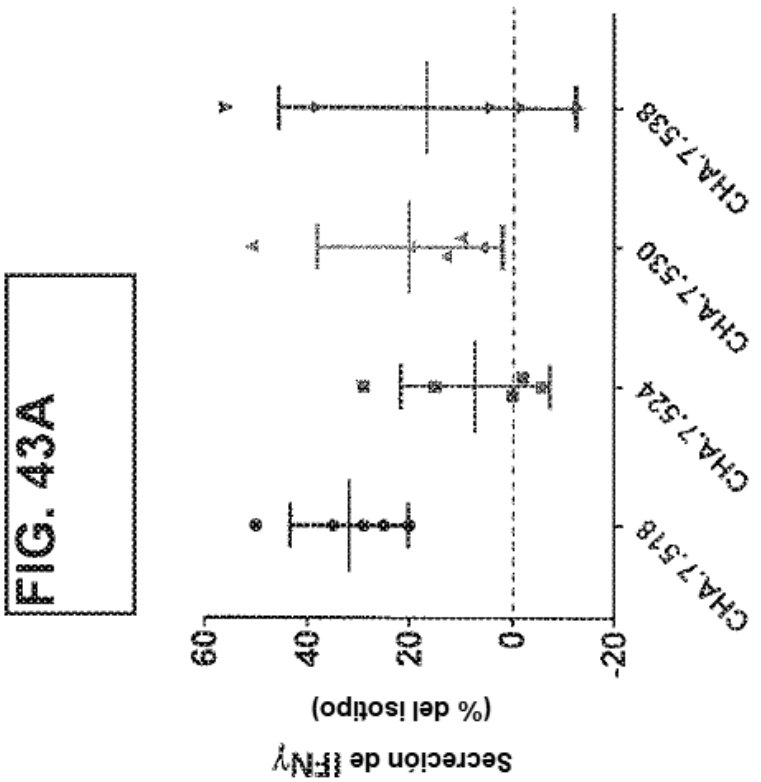


FIG. 43B

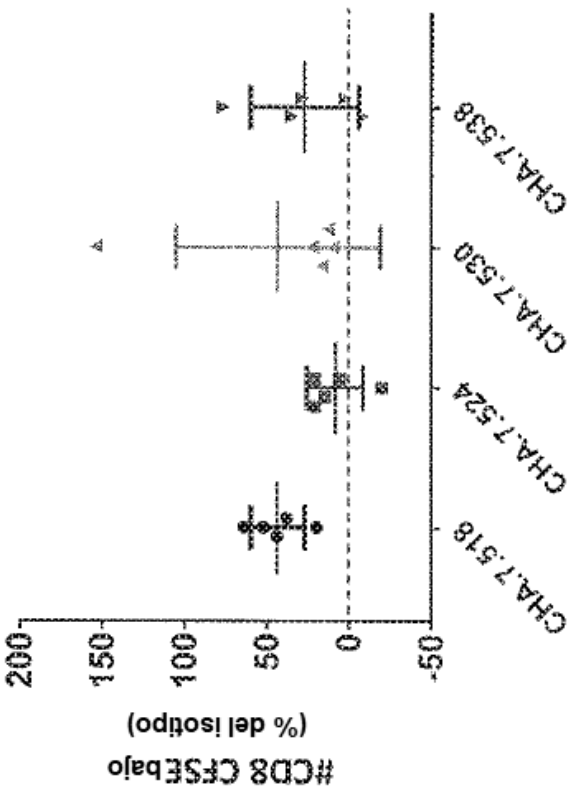


FIG. 43C

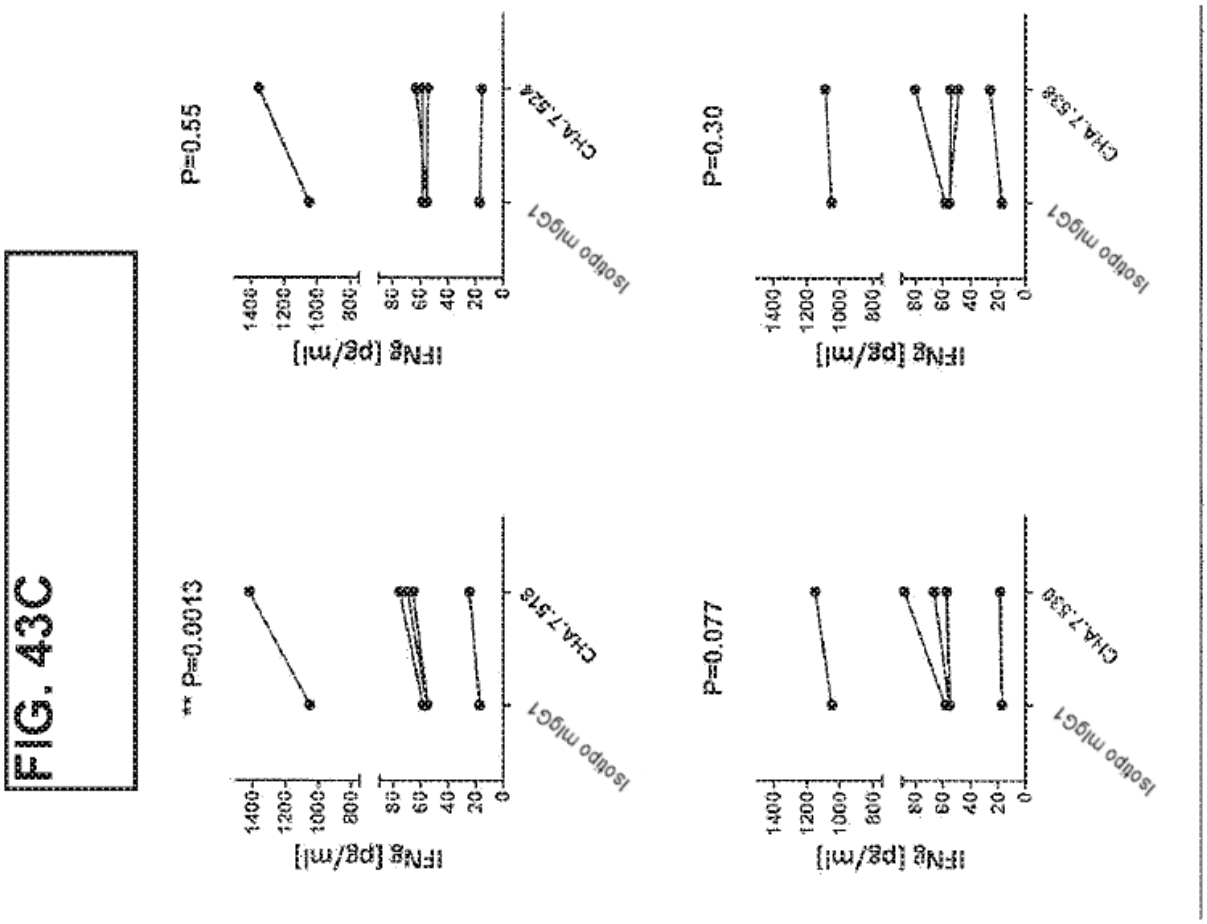

** P=0.0013
P=0.55
P=0.077
P=0.30
IFNg [pg/ml]
1400
1200
1000
800
80
60
40
20
0
Isotipo mIgG1
CHA.7.516
CHA.7.524
CHA.7.539
CHA.7.538

FIG. 44

% de efecto (frente a isotipo)	no. exp.	Donante	IFNg	CD4+ no. total CFSE bajo	CD8+ no. total CFSE bajo
CHA.7.518	410-IB-003	3	25%	24%	52%
	410-IB-003	72	29%	58%	64%
	400-ES-002	226	50%	16%	38%
	400-ES-002	345	20%	-26%	20%
	400-ES-002	ES_001	35%	39%	44%
	400-ES-003	ES_002	-3%	-22%	-17%
	400-ES-003	ES_004	-20%	-14%	-15%
	400-ES-003	ES_005	1%	5%	1%
	400-ES-003	ES_006	-11%	4%	12%
	400-ES-003	ES_007	4%	6%	15%
CHA.7.524	410-IB-003	3	-2%	-9%	-20%
	410-IB-003	72	0%	23%	15%
	400-ES-002	226	-6%	0%	6%
	400-ES-002	345	15%	-21%	21%
	400-ES-002	ES_001	29%	25%	21%
	400-ES-003	ES_002	-2%	-10%	-14%
	400-ES-003	ES_004	-18%	-8%	-7%
	400-ES-003	ES_005	12%	10%	12%
	400-ES-003	ES_006	2%	8%	-10%
	400-ES-003	ES_007	-4%	-4%	2%
CHA.7.530	410-IB-003	3	20%	16%	10%
	410-IB-003	72	51%	98%	154%
	400-ES-002	226	13%	3%	13%
	400-ES-002	345	6%	-25%	23%
	400-ES-002	ES_001	10%	20%	17%
	400-ES-003	ES_002	-15%	-23%	-29%
	400-ES-003	ES_004	-20%	-7%	-10%
	400-ES-003	ES_005	11%	5%	13%
	400-ES-003	ES_006	-20%	5%	17%
	400-ES-003	ES_007	0%	0%	11%
CHA.7.538	410-IB-003	3	-13%	1%	-8%
	410-IB-003	72	38%	53%	77%
	400-ES-002	226	56%	24%	29%
	400-ES-002	345	-2%	-22%	35%
	400-ES-002	ES_001	4%	0%	3%
	400-ES-003	ES_002	0%	1%	1%
	400-ES-003	ES_004	-21%	-9%	-5%
	400-ES-003	ES_005	18%	-1%	0%
	400-ES-003	ES_006	-21%	6%	13%
	400-ES-003	ES_007	-4%	11%	20%

FIG. 45A

Células	anticuerpo	Kd	gMFI
HEK hPVRIG	CPA.7.021 IgG4	2.939	18.17
HEK hPVRIG	CHA7.518 M1	0.36	42.24
Jurkat	CPA.7.021 IgG4	3.18	10.08
Jurkat	CHA7.518 M1	0.24	6.58

FIG. 45B

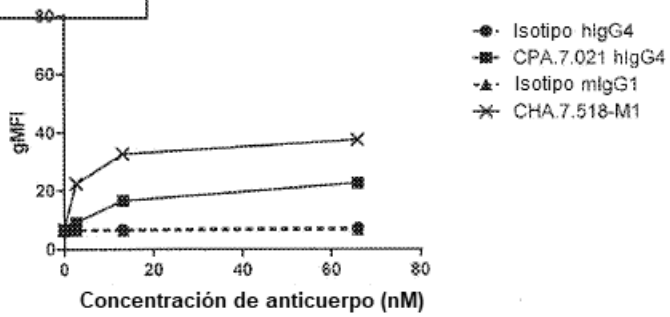


FIG. 45C

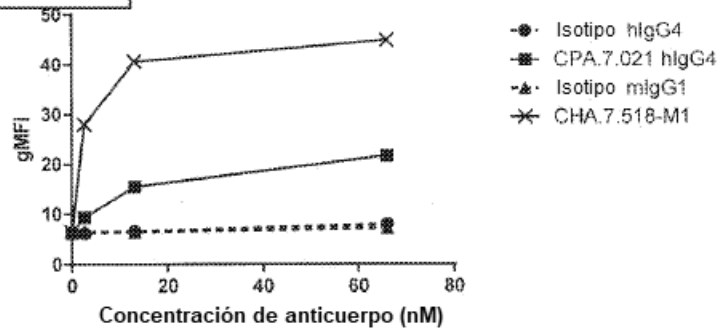


FIG. 46A

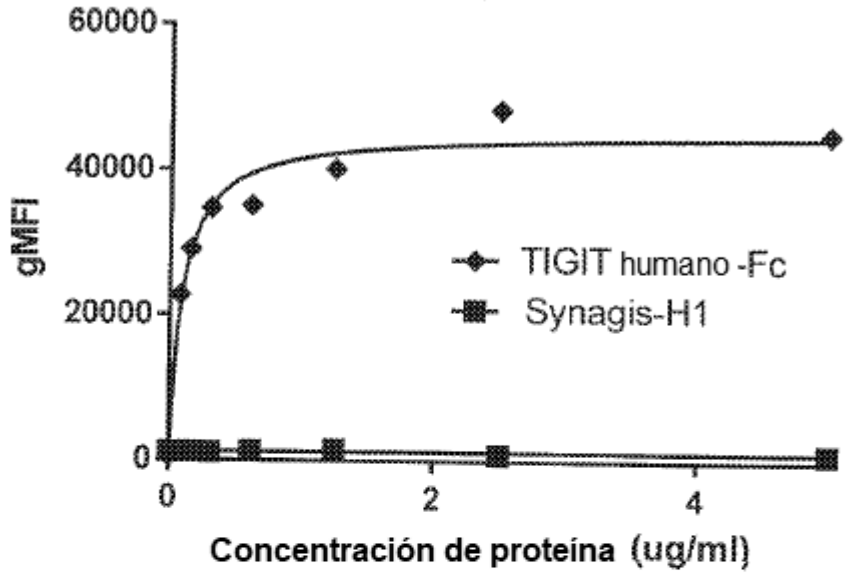


FIG. 46B

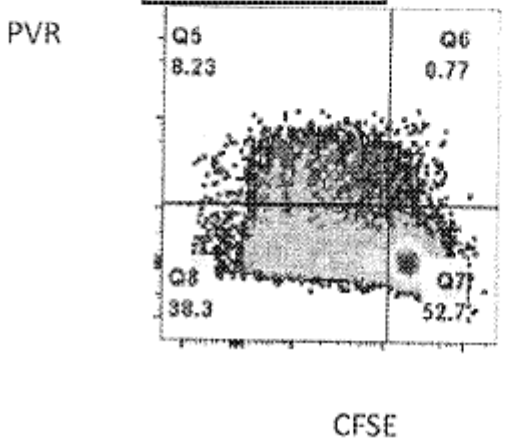


Figura 47A y 47B

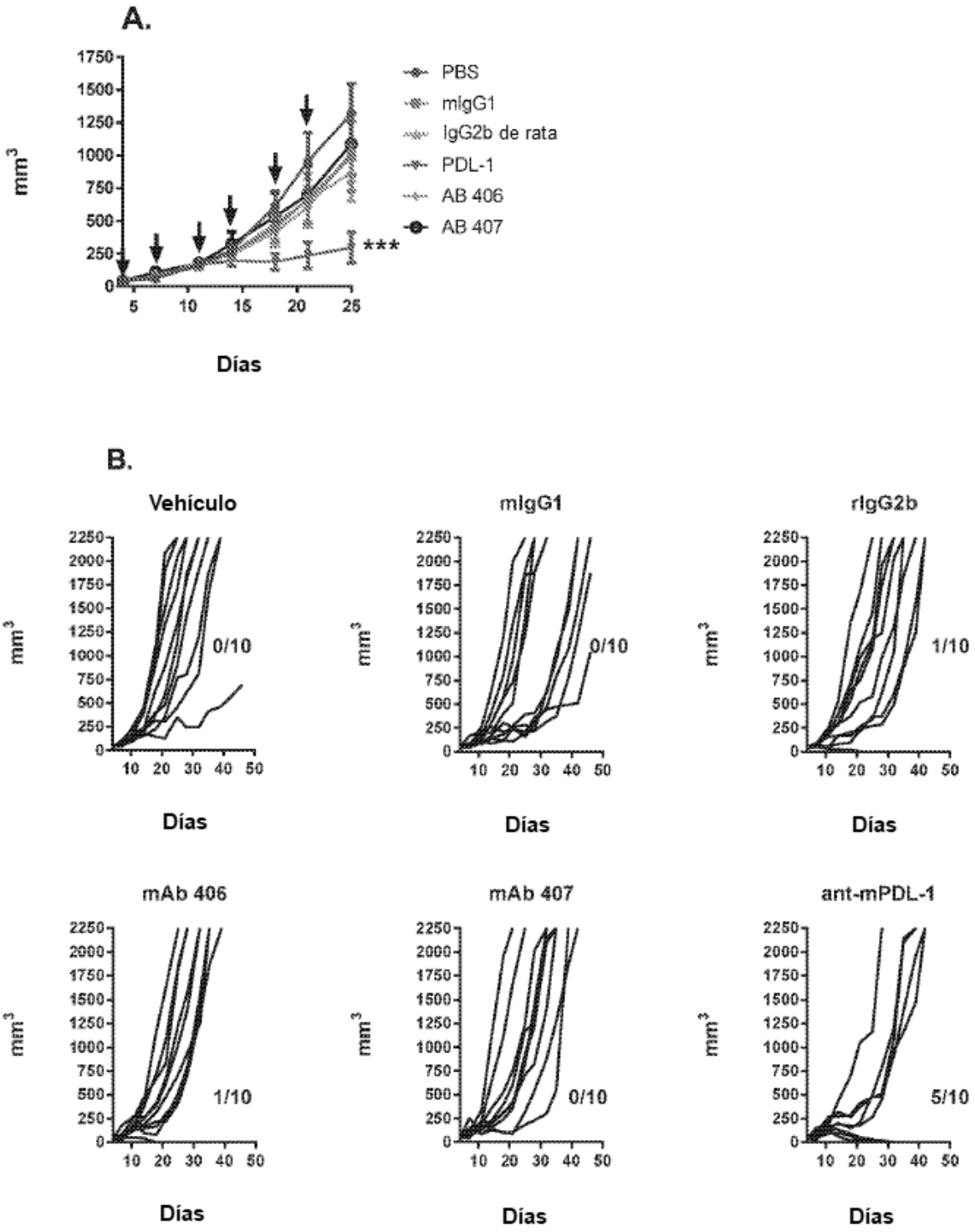


Figura 47C

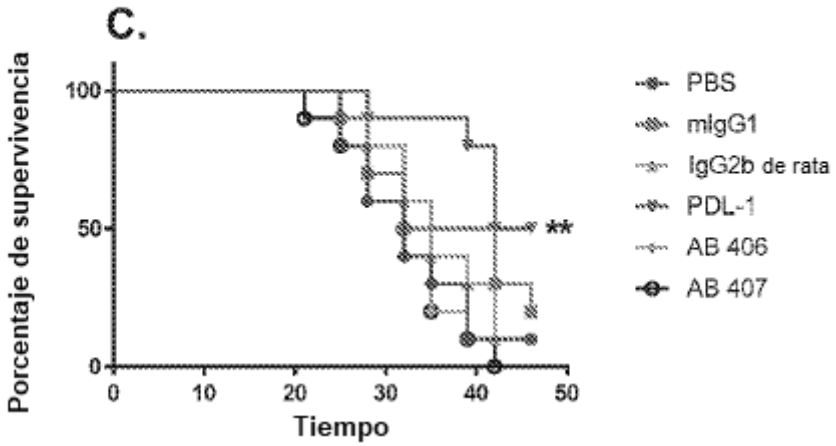

C.
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Tiempo
**
PBS
mIgG1
IgG2b de rata
PDL-1
AB 406
AB 407

Figura 48A y 48B

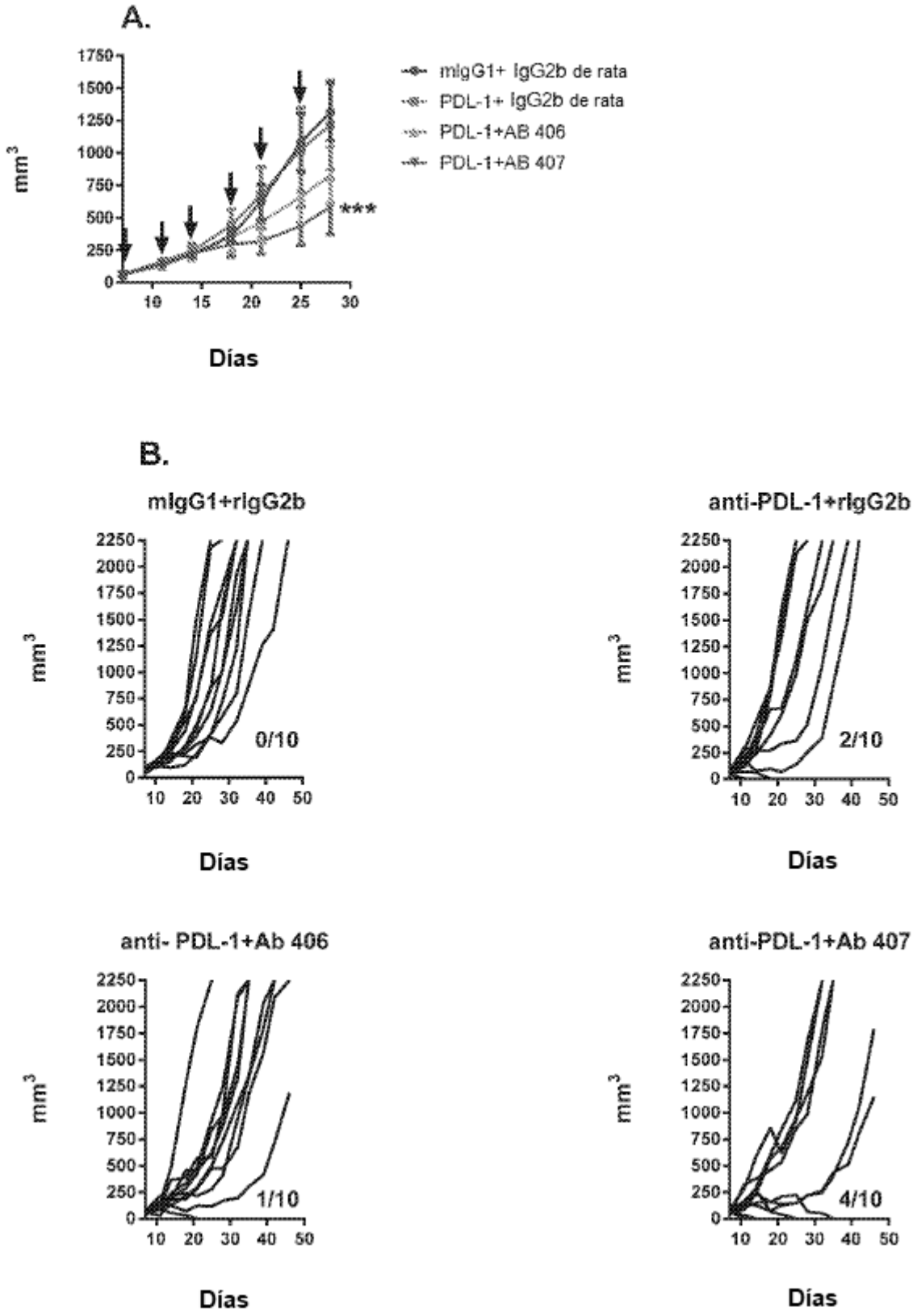


Figura 48C

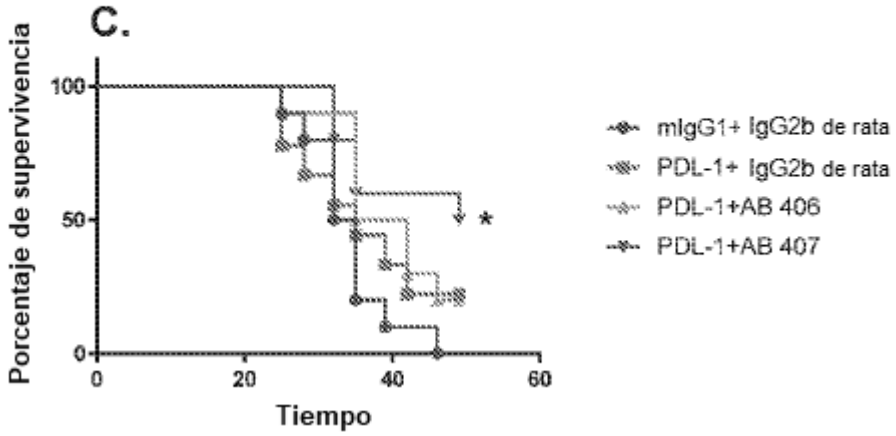

C.
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
20
40
60
Tiempo
*
mIgG1+ IgG2b de rata
PDL-1+ IgG2b de rata
PDL-1+AB 406
PDL-1+AB 407

Figura 49A, 49B, 49C y 49D

A)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena pesada: secuencia de amnoácidos

MEWNWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGSSVMISCKASGYTFTN
YAVHWIKQTTGQALEWTGYIAPGSGVTKYNEKFKGKATLTVDKSSTTAYMQLSSLTPVDTAVYYCASGTTRFAYWGQ
GTLVTVSSAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKG **(SEQ ID NO:84)**

B)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena pesada: secuencia de ADN

ATGGAATGGAACTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGAGTCCACTCCCAGGTCCAGC
TGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCAAAGCCTGGCTCTTCAGTGATGATTTCCTGCAAGGCTTCTGG
TTACACCTTTACCAACTATGCTGTGCACTGGATAAAGCAGACGACTGGACAGGCCCTTGAGTGGACT
GGATATATTGCTCCTGGAAGTGGAGTTACTAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGA
CTGTAGACAAATCCTCAACCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACACCTGTGGACACTGCGGT
CTATTACTGTGCAAGCGGAACTACGAGGTTTGCTTATTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCT
TCA GCCCAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGATGTGGTGATACAACCAGC
TCCACGGTGACTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGC **(SEQ ID NO:85)**

C)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena ligera: secuencia de amnoácidos

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVSLSSYNLMQWYQQKPGQEP
KILIYDASNLPSGIPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIATYYCQQSKDDPLTFGSGTKLEIK **(SEQ ID NO:86)**

D)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena ligera: secuencia de ADN

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTG
TGCTGACCCAGTCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACAATCTCCTGTAGAGCCAG
CCAAAGTGTCAGTTTATCCAGCTATAATCTCATGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGAACCC
AAAATCCTCATCTATGATGCATCCAACCTACCATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGCAACCTATTACTGTCA
GCAGAGTAAGGATGACCCGCTCACGTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA **(SEQ ID NO:87)**

Figura 50

Región constante de IgG1 humana **(SEQ ID NO:88)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante D265A de IgG1 humana **(SEQ ID NO:89)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante N297A de IgG1 humana **(SEQ ID NO:90)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG2 humana **(SEQ ID NO:91)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG3 humana **(SEQ ID NO:92)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCD
TPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Figura 50 continuación

Región constante de IgG4 humana (tipo salvaje) **(SEQ ID NO:93)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG4 humana (mutante S241P en la bisagra) **(SEQ ID NO:94)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera kappa humana **(SEQ ID NO:95)**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena ligera lambda humana **(SEQ ID NO:96)**

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA
SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Figura 51

ECD de TIGIT humano **(SEQ ID NO:97)**

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGP
GLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP

ECD de TIGIT de macaco cyno **(SEQ ID NO:98)**

MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPG
PGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFQIP

ECD de PVR humano **(SEQ ID NO:99)**

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMAVFHQTQGPSYSESKRLEFV
AARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWLRVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPM
ARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKP
QLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLI
RPVDKPINTTLICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSRN

Figura 52

Campaña	ID del anticuerpo	MFIr (OE/Par) hTIGIT	MFIr (OE/Par) cTIGIT
1	CPA.9.002	98	ND
1	CPA.9.009	8.7	ND
1	CPA.9.011	12	ND
1	CPA.9.012	12	ND
1	CPA.9.013	25	ND
1	CPA.9.014	110	ND
1	CPA.9.015	10	ND
1	CPA.9.018	16	ND
1	CPA.9.053	4.4	ND
2	CPA.9.057	30	ND
2	CPA.9.059	11	ND
2	CPA.9.064	5	ND
2	CPA.9.069	5	ND
2	CPA.9.071	5.7	ND
2	CPA.9.077	19	ND
2	CPA.9.081	7.6	ND
3	CPA.9.027	110	ND
3	CPA.9.049	94	ND
4	CPA.9.083	170	97
4	CPA.9.086	36	34
4	CPA.9.089	110	52
4	CPA.9.093	80	60
4	CPA.9.101	130	22
4	CPA.9.103	95	30

Figura 53A.: **CPA.9.086**

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS	160
vhCDR1	GFTFSSYA	161
vhCDR2	ISYAGEVK	162
vhCDR3	ARDPLPLHYYGMDV	163
HC de longitud completa (IgG4(S241P))	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	164
Dominio ligero variable (vl)	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLG	165
vlCDR1	SSNMGRRP	166
vlCDR2	SQN	167
vlCDR3	AVWDDIGRVLQ	168
Cadena ligera de longitud completa	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	169

Figura 53B: **CPA.9.083**

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTPVYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS	150
vhCDR1	GFTFSSYA	151
vhCDR2	ISYDGTPV	152
vhCDR3	ARDPLPLHYYGMDV	153
HC de longitud completa (IgG4(S241P))	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTPVYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	154
Dominio ligero variable (vl)	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDGDRRSLQLGGGTQLAVLG	155
vlCDR1	SSNMGRRP	156
vlCDR2	SQN	157
vlCDR3	AVWDGDRRSLQ	158
Cadena ligera de longitud completa	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDGDRRSLQLGGGTQLAVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	159

ES 2 774 320 T3

Figura 53C: **CHA.9.547.13**

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGTNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGTLVTVSS	**560**
vhCDR1	GFTFSSYIMS	**561**
vhCDR2	TISGGGTNTY	**562**
vhCDR3	WLLSYYAMDY	**563**
HC de longitud completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGTNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**564**
Dominio ligero variable (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTKLEIK	**565**
vlCDR1	RASQNINVWLS	**566**
vlCDR2	KASKSHT	**567**
vlCDR3	QQGQSYPYT	**568**
Cadena ligera de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**569**

ES 2 774 320 T3

Figura 54

Anticuerpo	Fecha	K_D ± 95% Intervalo de confianza del ajuste
BM26	12/12/2016	490 pM ± 80 pM
BM29	12/12/2016	760 pM ± 180 pM
CPA.9.027	18/10/2016	170 pM ± 40 pM
CPA.9.049	21/7/2016	260 pM ± 170 pM
CPA.9.059	18/10/2016	290 pM ± 110 pM
CHA.9.536	12/12/2016	880 pM ± 260 pM
CHA.9.541	12/12/2016	1.24 nM ± 470 pM
CHA.9.543	12/12/2016	10.2 nM ± 3.27 nM
CHA.9.546	12/12/2016	1.22 nM ± 390 pM
CHA.9.547	12/12/2016	720 pM ± 200 pM
CHA.9.560	12/12/2016	1.02 nM ± 210 pM

Figura 55

Anticuerpo	Fecha	K_D ± 95% Intervalo de confianza del ajuste
BM26	12/12/2016	670 pM ± 240 pM
BM29	12/12/2016	Ajuste no Fiable
CPA.9.027	18/10/2016	2.25 nM ± 760 pM
CPA.9.049	21/7/2016	1.88 nM ± 1.09 nM
CPA.9.059	2/9/2016	No Unión
CHA.9.536	12/12/2016	2.15 nM ± 590 pM
CHA.9.541	12/12/2016	2.09 nM ± 280 pM
CHA.9.543	12/12/2016	17.2 nM ± 3.82 nM
CHA.9.546	12/12/2016	1.36 nM ± 270 pM
CHA.9.547	12/12/2016	1.40 nM ± 390 pM
CHA.9.560	12/12/2016	1.84 nM ± 140 pM

Figura 56

MAb	TIGIT humano			TIGIT de cyno			TIGIT de ratón		
	k_a (/s)	k_d (/M-s)	K_D (M)	k_a (/s)	k_d (/M-s)	K_D (M)	k_a (/s)	k_d (/M-s)	K_D (M)
CPA.9.027	1.94E+06	2.51E-04	1.30E-10	Cinéticas Complejas			4.50E+05	3.60E-02	8.00E-08
CPA.9.049	1.68E+06	1.58E-04	9.45E-11	Cinéticas Complejas			4.65E+05	3.85E-02	8.27E-08
CPA.9.059	1.88E+06	4.01E-05	2.13E-11	Cinéticas Complejas			N/A		
CHA.9.536	8.81E+05	*1.00E-05	1.13E-11	1.18E+06	2.90E-04	2.45E-10	No unión		
CHA.9.541	4.51E+05	3.64E-05	8.08E-11	1.75E+06	*1.00E-05	5.73E-12	No unión		
CHA.9.543	1.97E+06	4.54E-05	2.31E-11	6.46E+06	*1.00E-05	1.55E-12	No unión		
CHA.9.546	1.19E+06	2.68E-04	2.26E-10	2.20E+06	1.23E-03	5.56E-10	No unión		
CHA.9.547	2.69E+06	1.03E-04	3.84E-11	3.34E+06	5.15E-04	1.54E-10	No unión		
CHA.9.560	1.04E+06	1.59E-06	*1.52E-12	3.05E+06	1.90E-04	6.23E-11	No unión		
BM26	2.05E+06	4.94E-05	2.41E-11	7.99E+06	*1.00E-05	1.25E-12	No unión		
BM29	1.63E+06	2.45E-05	1.5E-11	Complejo			No unión		

Figura 57A y 57B

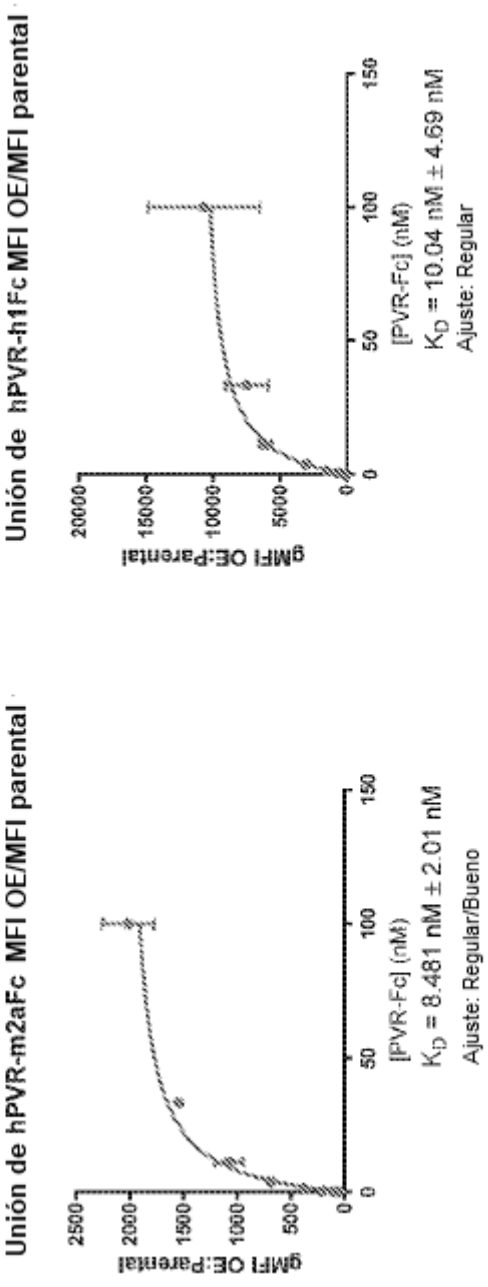


Figura 58

Anticuerpo	6.7 nM mAb		1.3 nM mAb		266 pM mAb	
	Bloqueante (Si/No)	gMFI	Bloqueante (Si/No)	gMFI	Bloqueante (Si/No)	gMFI
BM26	Si	234	Si	401	Si	719
Synagis	No	828	No	964	No	959
CPA.9.027	Si	208	Si	253	Si	529
CPA.9.049	Si	215	Si	276	Si	511
CPA.9.059	Si	209	Si	262	Si	509

Figura 59

Anticuerpo	Fecha del Ensayo	CI50 (nM)
BM26	12/10/2016	0.37
BM29	12/10/2016	0.60
CHA.9.536	12/10/2016	0.92
CHA.9.541	12/10/2016	1.24
CHA.9.546	12/10/2016	0.63
CHA.9.547	12/10/2016	0.49
CHA.9.560	12/10/2016	1.12

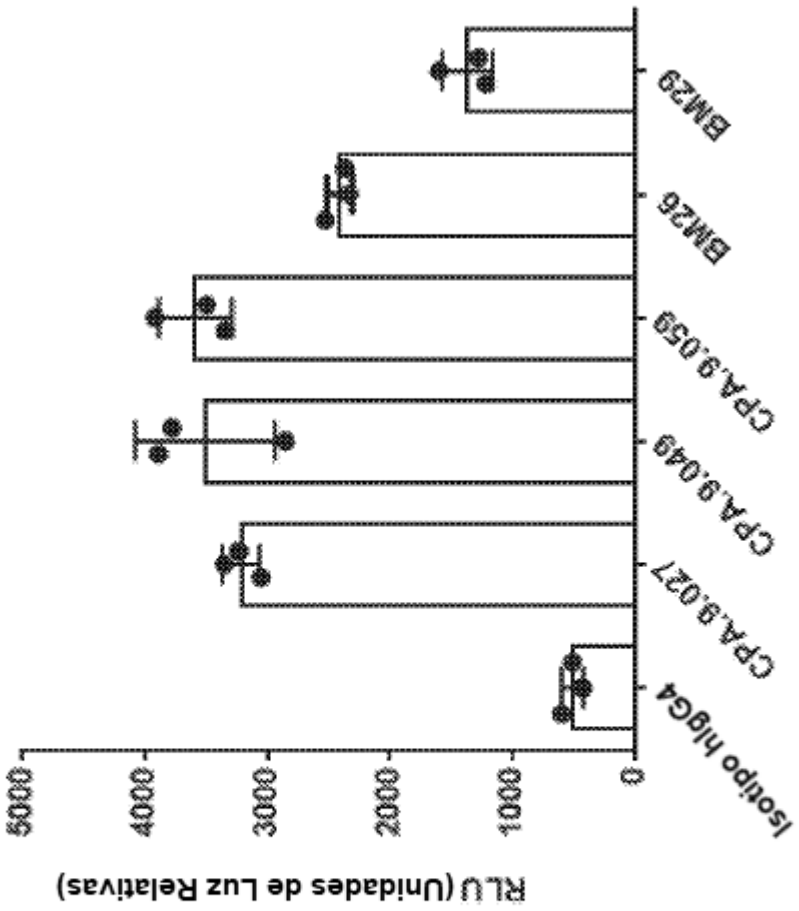
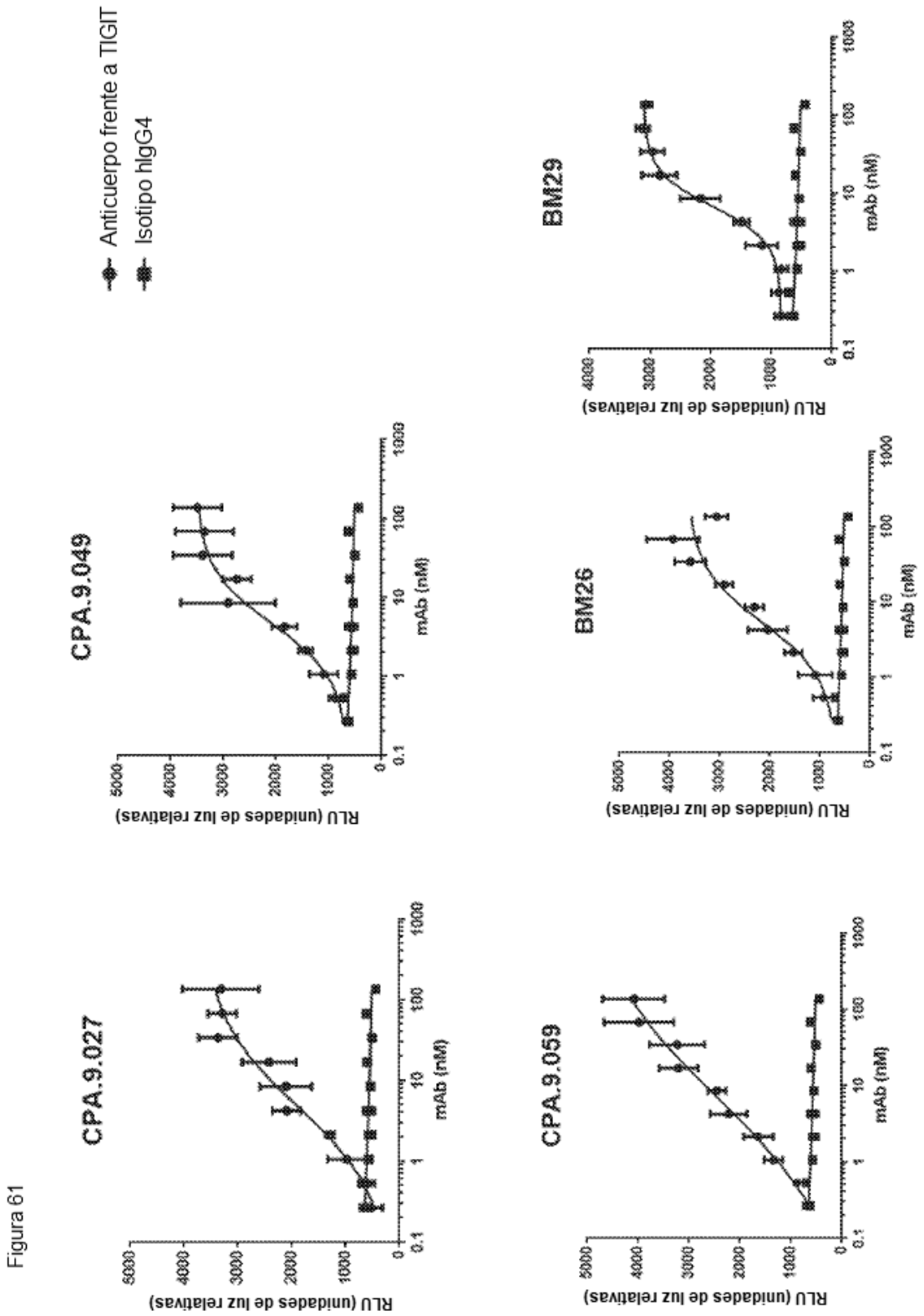

RLU (Unidades de Luz Relativas)
0
1000
2000
3000
4000
5000
Isotipo hIgG4
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
BM26
BM29

Figura 60

Figura 61


Anticuerpo frente a TIGIT
Isotipo hIgG4
CPA.9.049
BM29
BM26
CPA.9.027
CPA.9.059
RLU (unidades de luz relativas)
mAb (nM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0.1
1
10
100
1000

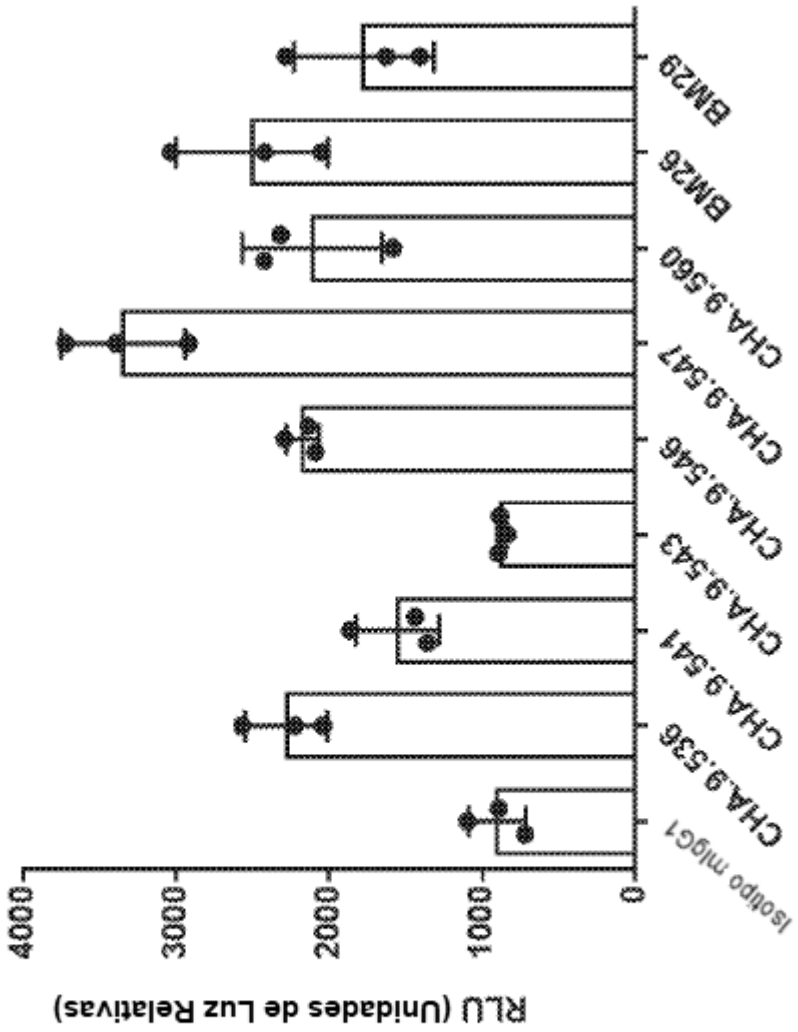

RLU (Unidades de Luz Relativas)
4000
3000
2000
1000
0
isotipo mIgG1
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
BM29

Figura 62

Figura 63

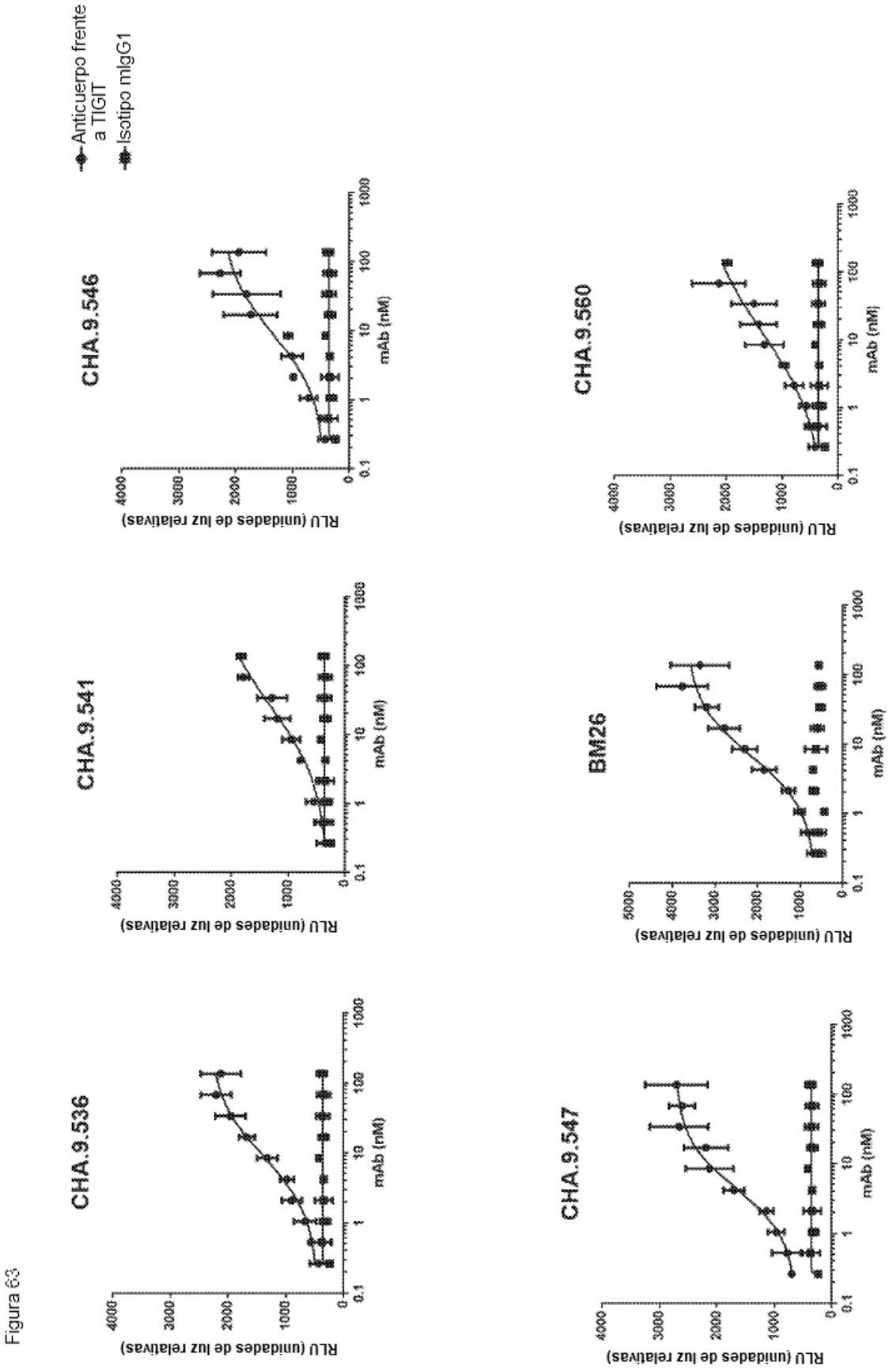

Anticuerpo frente a TIGIT
Isotipo mIgG1
CHA.9.546
CHA.9.560
CHA.9.541
BM26
CHA.9.536
CHA.9.547
RLU (unidades de luz relativas)
mAb (nM)

Figura 64

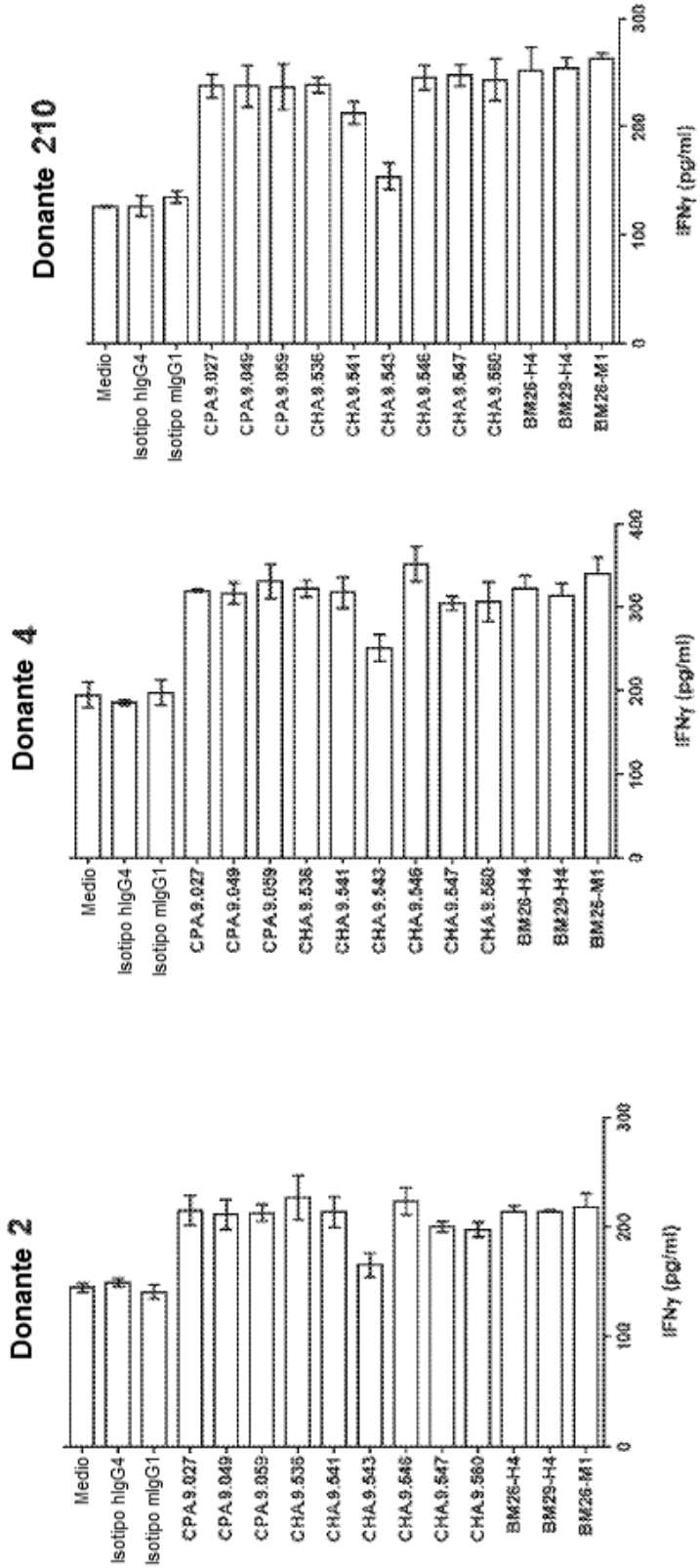

Donante 2
Donante 4
Donante 210
Medio
Isotipo hIgG4
Isotipo mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26-H4
BM29-H4
BM26-M1
IFNγ (pg/ml)
0
100
200
300
400

Figura 65

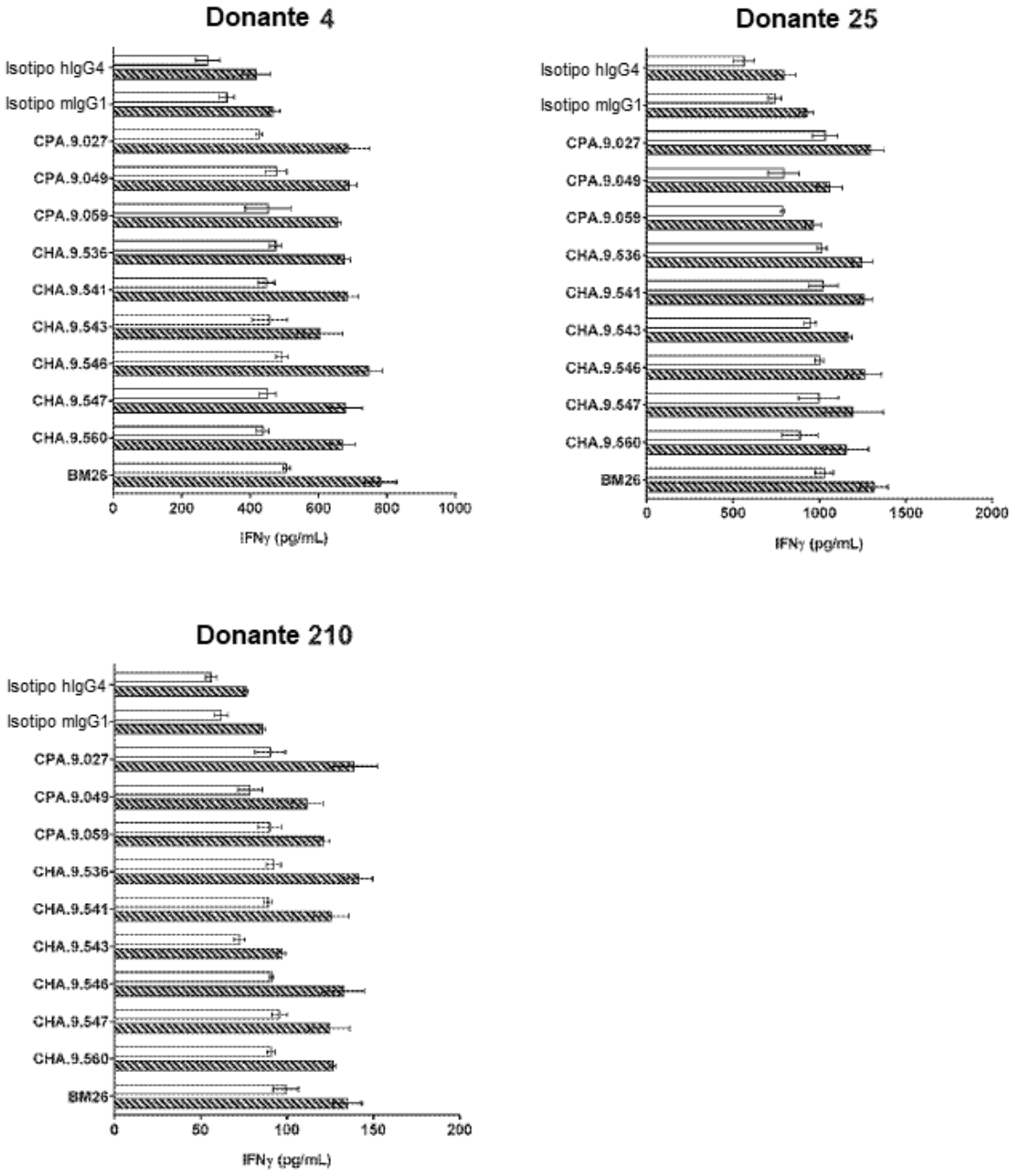

Donante 4
Isotipo hIgG4
Isotipo mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
0
200
400
600
800
1000
IFNγ (pg/mL)
Donante 25
Isotipo hIgG4
Isotipo mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
0
500
1000
1500
2000
IFNγ (pg/mL)
Donante 210
Isotipo hIgG4
Isotipo mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
0
50
100
150
200
IFNγ (pg/mL)

Figura 66

	Promedio de 3 Donantes	
	Monoterapia	Combinación con CHA.7.518.1
CHA.7.518.1 + Isotipo hIgG4	43	
CPA.9.027-H4	66	142
CPA.9.049-H4	51	112
CPA.9.059-H4	55	108
CHA.7.518.1 + Isotipo mIgG1	39	
CHA.9.536-M1	43	100
CHA.9.541-M1	39	93
CHA.9.543-M1(No bloqueante)	27	65
CHA.9.546-M1	43	103
CHA.9.547-M1	47	96
CHA.9.560-M1	38	94
BM26	49	107

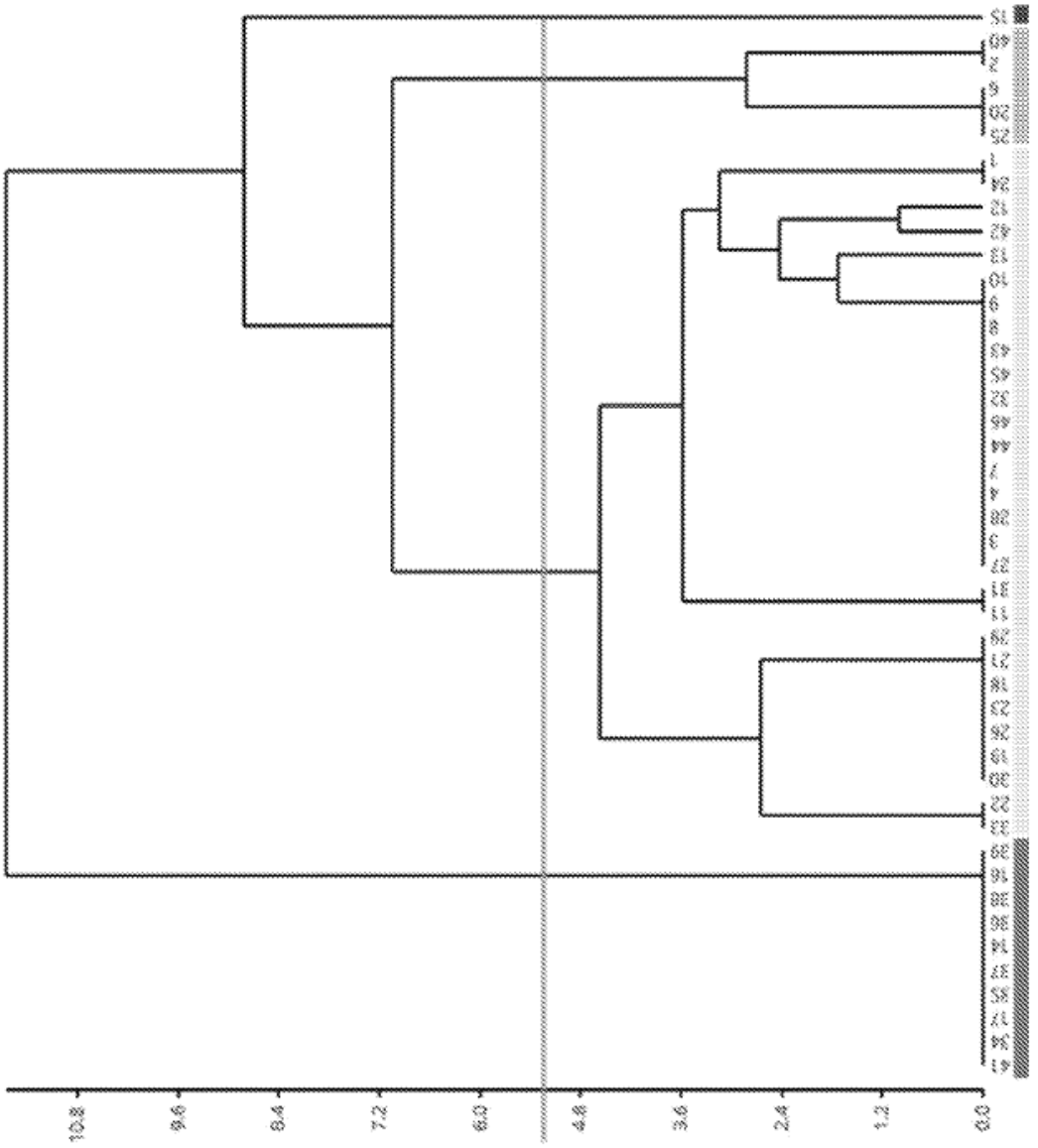


Figura 67

Figura 68

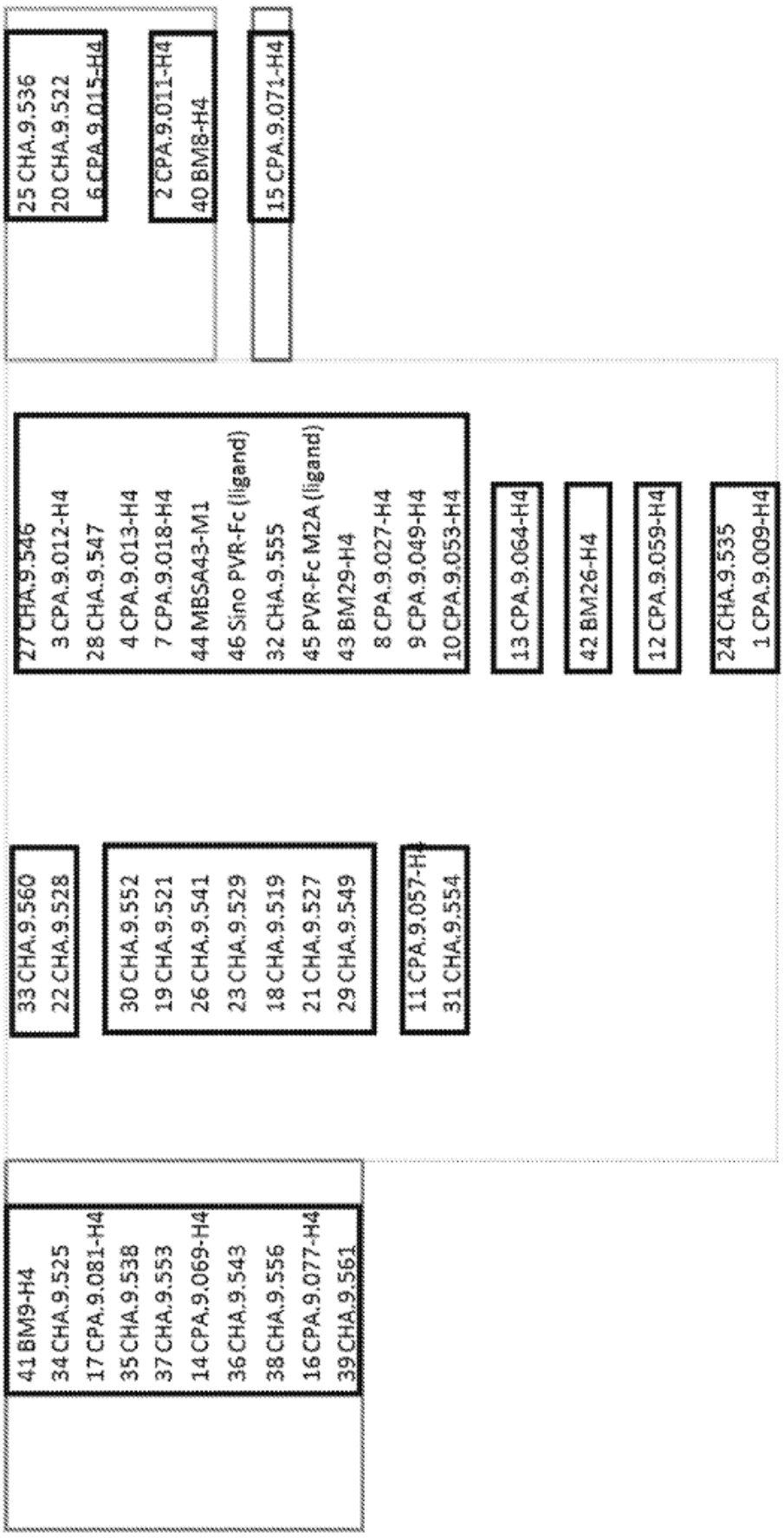

41 BM9-H4
34 CHA.9.525
17 CPA.9.081-H4
35 CHA.9.538
37 CHA.9.553
14 CPA.9.069-H4
36 CHA.9.543
38 CHA.9.556
16 CPA.9.077-H4
39 CHA.9.561
33 CHA.9.560
22 CHA.9.528
30 CHA.9.552
19 CHA.9.521
26 CHA.9.541
23 CHA.9.529
18 CHA.9.519
21 CHA.9.527
29 CHA.9.549
11 CPA.9.057-H4
31 CHA.9.554
27 CHA.9.546
3 CPA.9.012-H4
28 CHA.9.547
4 CPA.9.013-H4
7 CPA.9.018-H4
44 MBSA43-M1
46 Sino PVR-Fc (ligand)
32 CHA.9.555
45 PVR-Fc M2A (ligand)
43 BM29-H4
8 CPA.9.027-H4
9 CPA.9.049-H4
10 CPA.9.053-H4
13 CPA.9.064-H4
42 BM26-H4
12 CPA.9.059-H4
24 CHA.9.535
1 CPA.9.009-H4
25 CHA.9.536
20 CHA.9.522
6 CPA.9.015-H4
2 CPA.9.011-H4
40 BM8-H4
15 CPA.9.071-H4

Figura 69

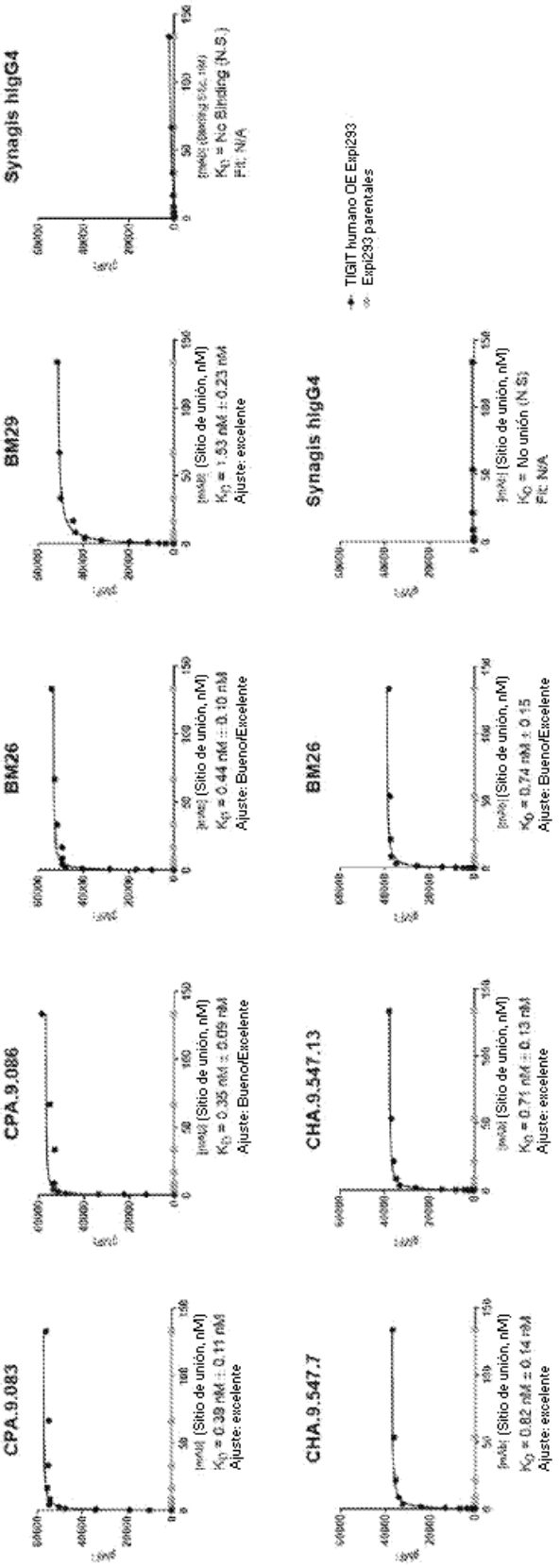

CPA.9.083
CPA.9.086
BM26
BM29
Synagis higG4
CHA.9.547.7
CHA.9.547.13
BM26
Synagis higG4
TIGIT humano OE Expi293
Expi293 parentales
(Sitio de unión, nM)
Ajuste: excelente
Ajuste: Bueno/Excelente
Ajuste: Bueno/Excelente
Ajuste: excelente
Ajuste: excelente
Ajuste: Bueno/Excelente
Fit: N/A
Fit: N/A

Figura 70

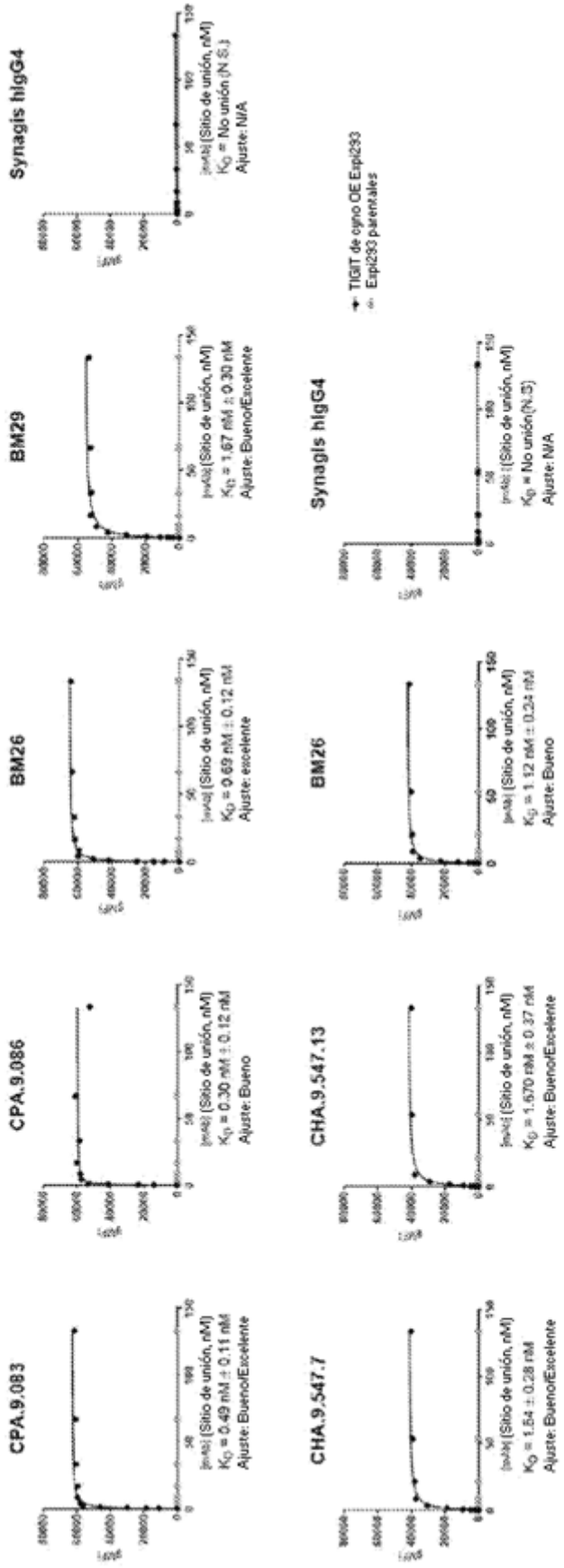

CPA.9.083
CPA.9.086
BM26
BM29
Synagis hIgG4
CHA.9.547.7
CHA.9.547.13
BM26
Synagis hIgG4
TIGIT de cyno OE Expi293
Expi293 parentales
[nM/s] (Sitio de unión, nM)
K_D = 0.49 nM ± 0.11 nM
Ajuste: Bueno/Excelente
K_D = 0.30 nM ± 0.12 nM
Ajuste: Bueno
K_D = 0.69 nM ± 0.12 nM
Ajuste: excelente
K_D = 1.67 nM ± 0.30 nM
Ajuste: Bueno/Excelente
K_D = No unión (N.S.)
Ajuste: N/A
K_D = 1.64 ± 0.28 nM
Ajuste: Bueno/Excelente
K_D = 1.670 nM ± 0.37 nM
Ajuste: Bueno/Excelente
K_D = 1.12 nM ± 0.24 nM
Ajuste: Bueno
K_D = No unión(N.S)
Ajuste: N/A

Figura 71

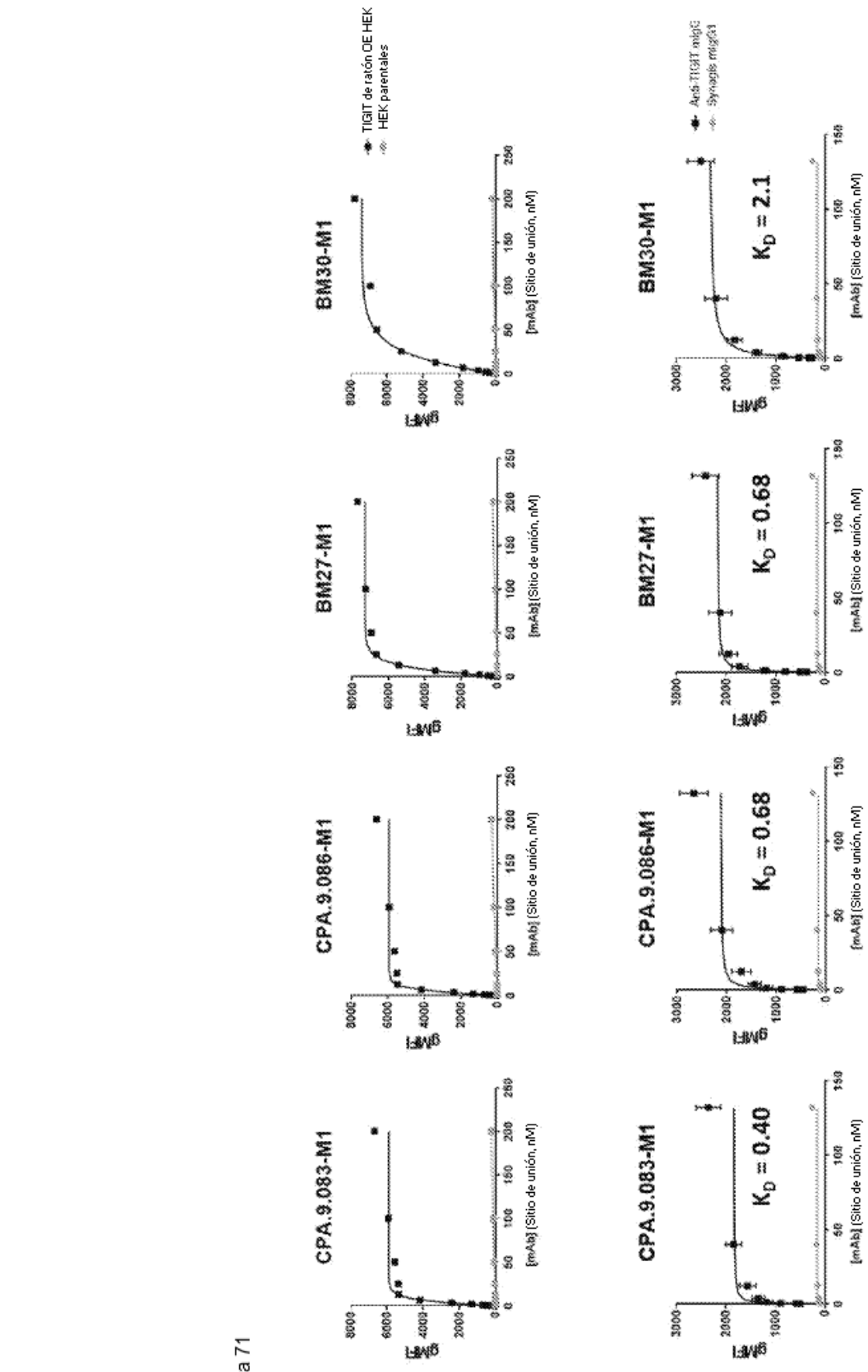
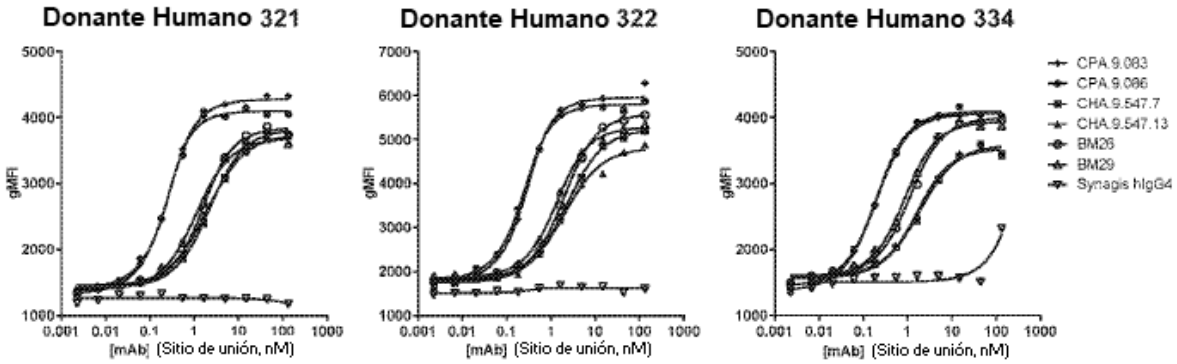
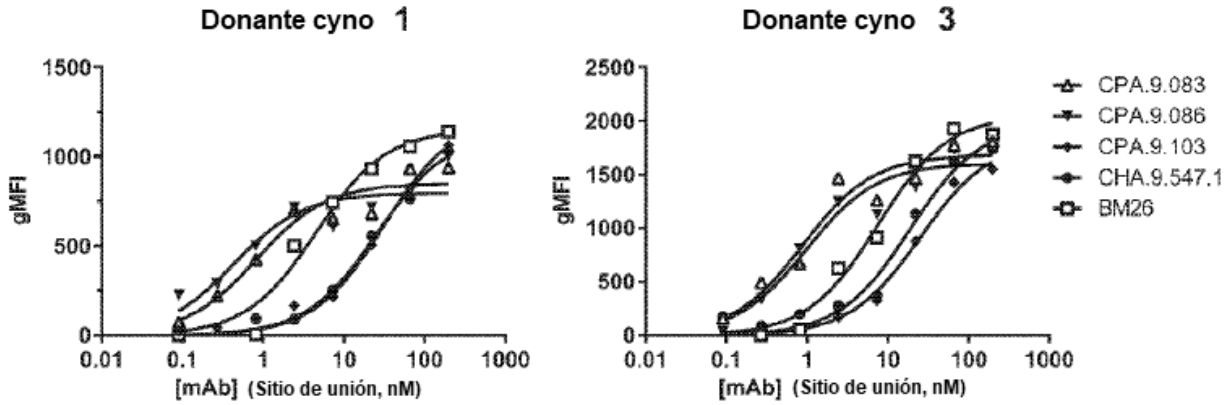

A.
B.
CPA.9.083-M1
CPA.9.086-M1
BM27-M1
BM30-M1
TIGIT de ratón DE HEK
HEK parentales
K_D = 0.40
K_D = 0.68
K_D = 0.68
K_D = 2.1
[mAb] (Sitio de unión, nM)

Figura 72



Ab anti-TIGIT	K_D CD8⁺ Tem (nM)		
	Donante 321	Donante 322	Donante 334
CPA.9.083	0.13	0.12	0.13
CPA.9.086	0.09	0.11	0.13
CHA.9.547.7	1.8	2.1	1.8
CHA.9.547.13	2.0	1.9	1.2
BM26	0.93	1.4	0.81
BM29	0.88	0.91	0.59

Figura 73



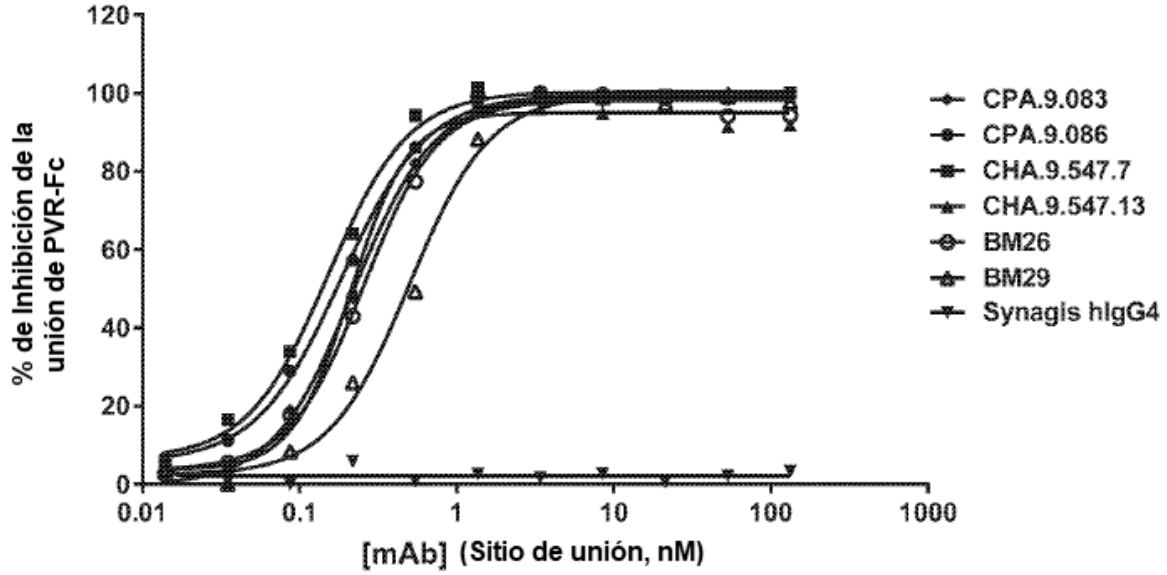
Ab anti-TIGIT	K_D $CD8^+$ Tem Donante 1 (nM)	K_D $CD8^+$ Tem Donante 3 (nM)
CPA.9.083	0.82	0.88
CPA.9.086	0.43	0.98
CPA.9.103	31	25
CHA.9.547.1	25	19
BM26	4.6	7.5

Figura 74

Nombre	TIGIT humano-His			TIGIT de cyno-His			TIGIT de ratón-His		
	k_a (/s)	K_d (/M-s)	K_D (pM)	k_a (/s)	K_d (/M-s)	K_D (pM)	k_a (/s)	K_d (/M-s)	K_D (pM)
CPA.9.083	6.00E+06	1.00E-05	1.7	Cinética compleja			2.73E+06	1.19E-03	434
CPA.9.086	4.40E+06	1.00E-05	2.3	Cinética compleja			1.83E+06	1.21E-03	663
CPA.9.103	2.48E+06	1.60E-05	6.4	1.63E+06	5.50E-04	337	1.60E+07	0.4	25,000
CHA.9.547.1	2.47E+06	2.42E-04	98	1.03E+06	1.17E-03	1131	No unión		
CHA.9.547.7	1.60E+06	5.51E-05	35	7.45E+05	3.40E-04	456	No unión		
BM26	2.50E+06	1.00E-05	4.0	2.83E+06	1.00E-05	3.5	No unión		
BM29	9.10E+05	1.00E-05	11	3.45E+06	5.30E-03	1537	No unión		

ES 2 774 320 T3

Figura 75



Ab anti-TIGIT	CI_{50} Sitio de unión (nM), n=1	CI_{50} Sitio de unión (nM), n=2
CPA.9.083	0.47	0.22
CPA.9.086	0.36	0.18
CHA.9.547.7	0.21	0.15
CHA.9.547.13	0.26	0.21
BM26	0.45	0.26
BM29	1.0	0.50

Figura 76

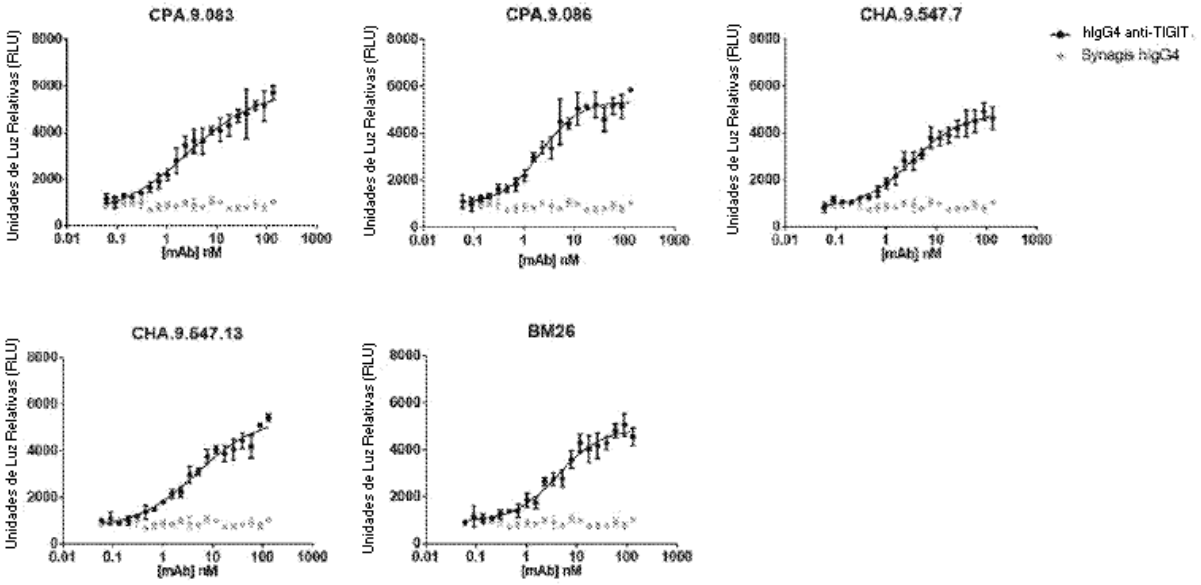
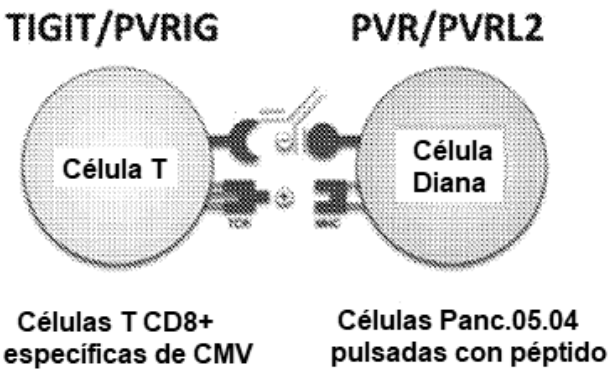
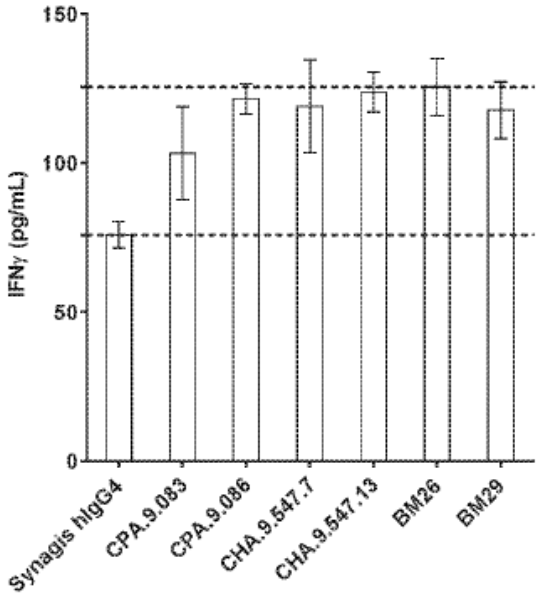

CPA.9.083
CPA.9.086
CHA.9.547.7
CHA.9.547.13
BM26
Unidades de Luz Relativas (RLU)
[mAb] nM
hIgG4 anti-TIGIT
Synagis hIgG4

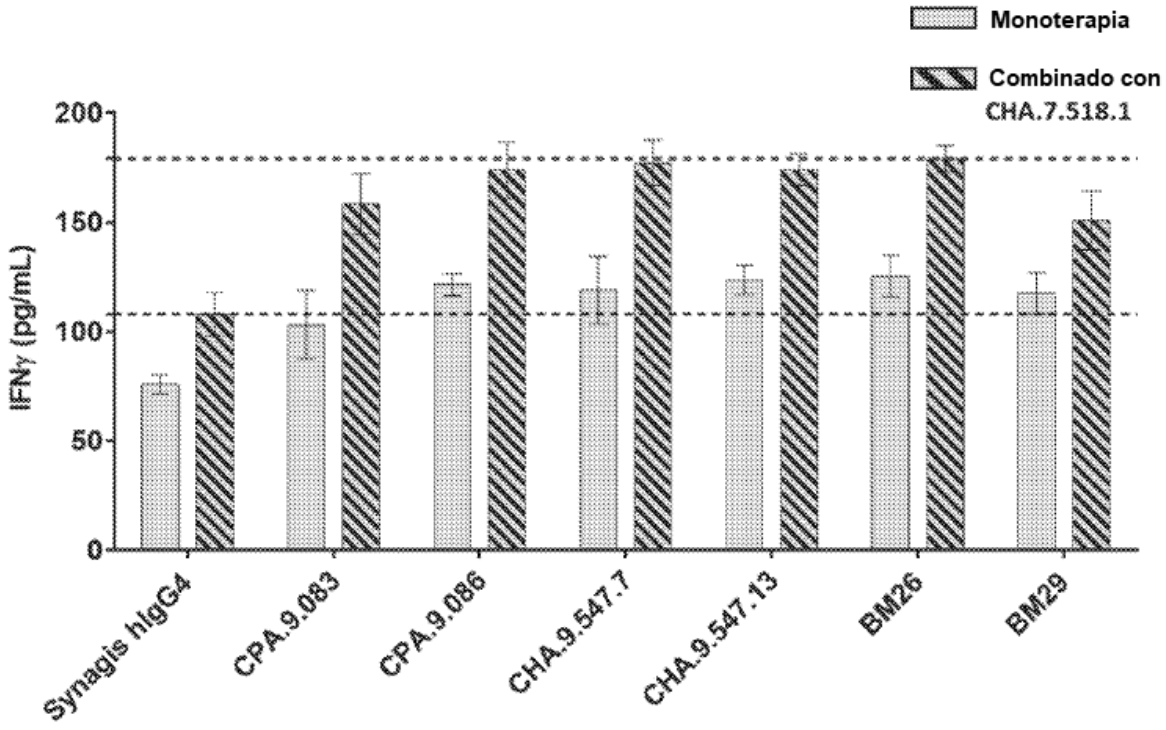
Figura 77





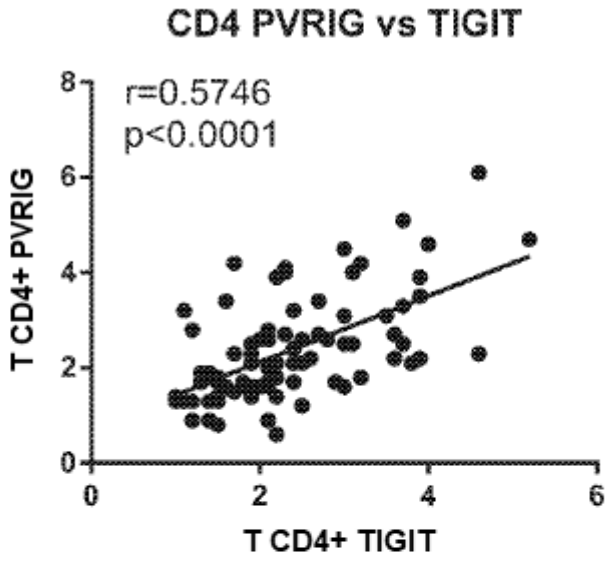
	Donante 4 (n=1)	Donante 4 (n=2)
CPA.9.083	36	111
CPA.9.086	60	100
CHA.9.547.7	57	125
CHA.9.547.13	63	108
BM26	65	84
BM29	55	103

Figura 78



	Donante 4 (n=1)	Donante 4 (n=2)
CPA.9.083	46	149
CPA.9.086	61	115
CHA.9.547.7	64	114
CHA.9.547.13	61	107
BM26	66	88
BM29	39	67

Figura 79


CD4 PVRIG vs TIGIT
r=0.5746
p<0.0001
T CD4+ PVRIG
T CD4+ TIGIT
0
2
4
6
8

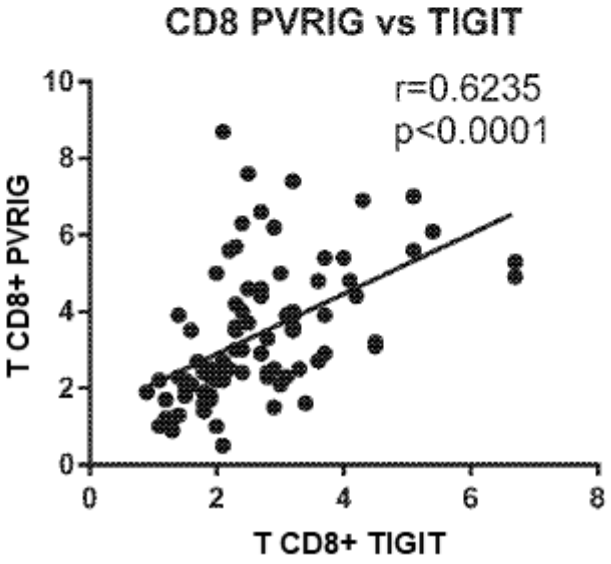
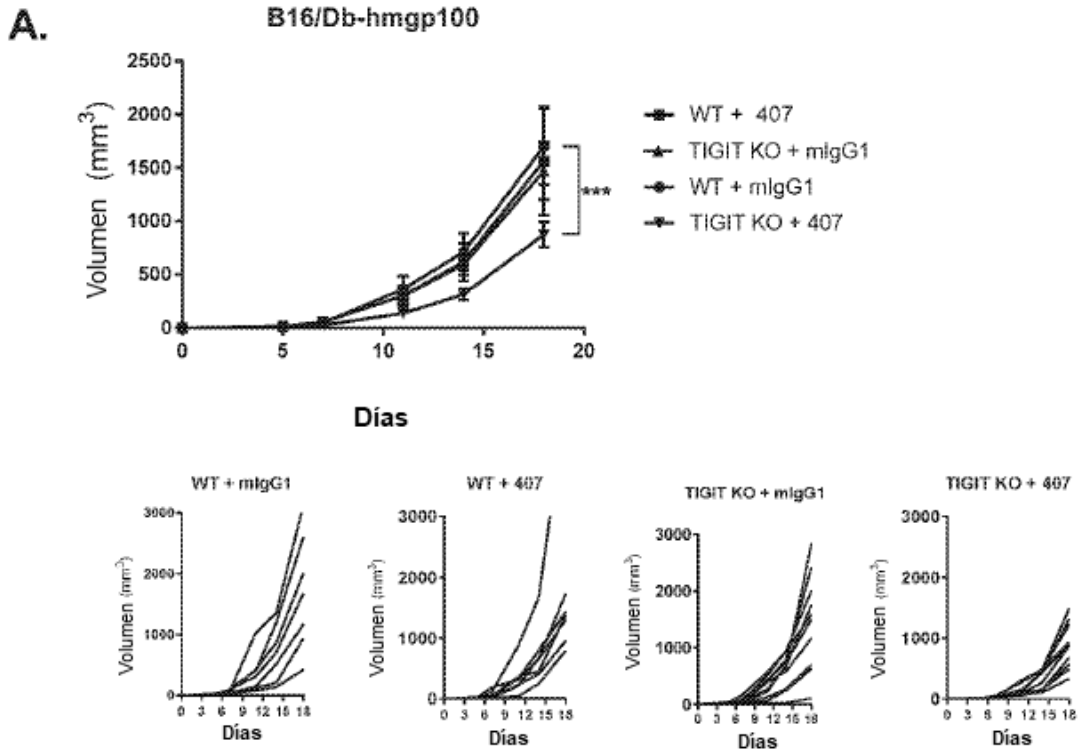

CD8 PVRIG vs TIGIT
r=0.6235
p<0.0001
T CD8+ PVRIG
T CD8+ TIGIT
0
2
4
6
8
10

Figura 80

A.



B.

TGI comparado con WT + mIgG1	Día 11	Día 14	Día 18
WT+ 407	17%	13%	8%
TIGIT-KO + mIgG1	17%	17%	13%
TIGIT-KO + 407	63%	53%	49%

C.

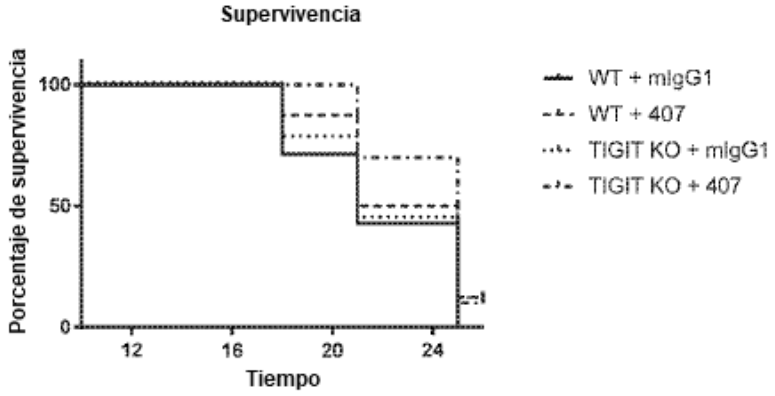


Figura 81

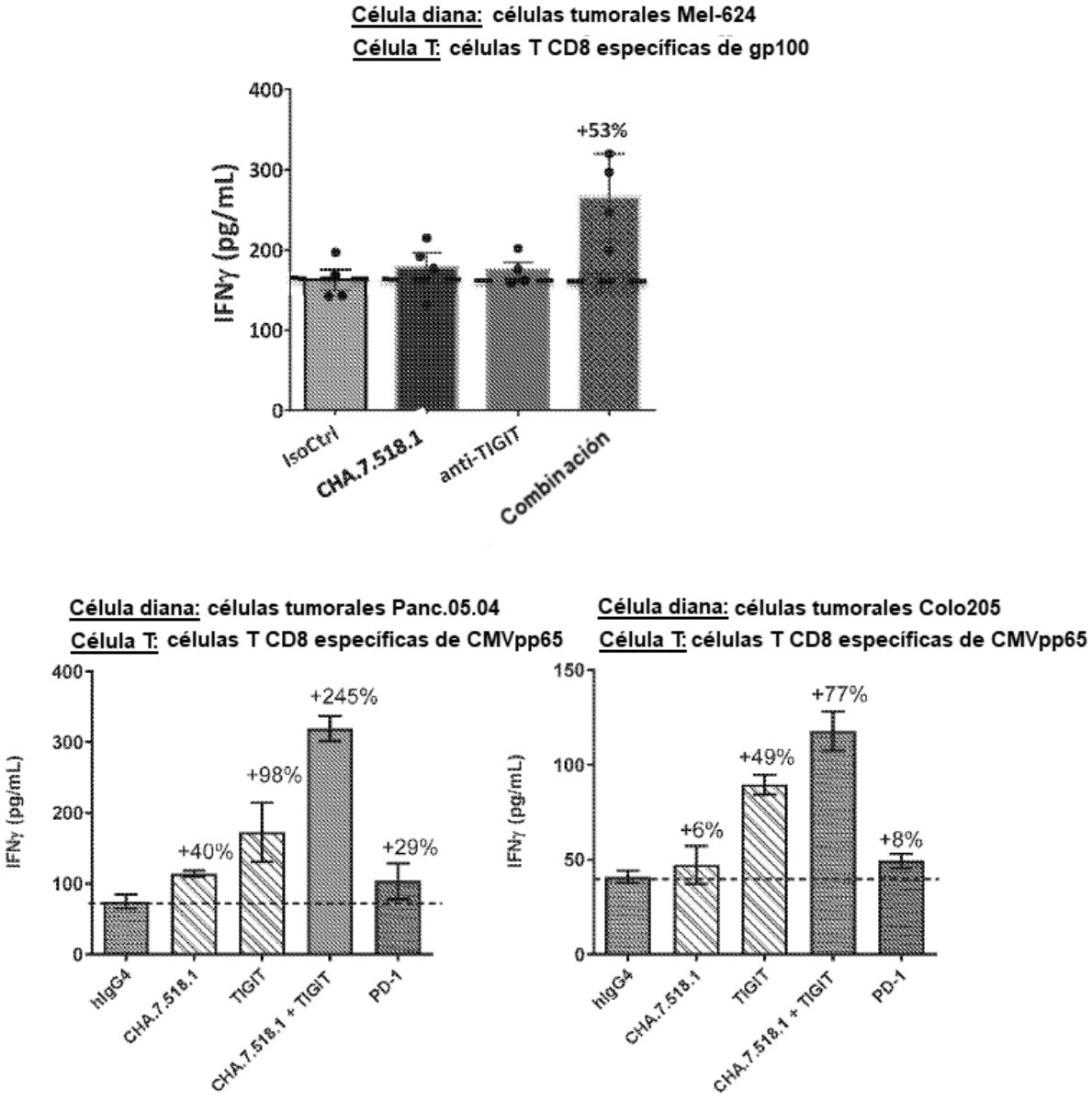

Célula diana: células tumorales Mel-624
Célula T: células T CD8 específicas de gp100
IFNγ (pg/mL)
400
300
200
100
0
+53%
IsoCtrl
CHA.7.518.1
anti-TIGIT
Combinación
Célula diana: células tumorales Panc.05.04
Célula T: células T CD8 específicas de CMVpp65
IFNγ (pg/mL)
400
300
200
100
0
+40%
+98%
+245%
+29%
hIgG4
CHA.7.518.1
TIGIT
CHA.7.518.1 + TIGIT
PD-1
Célula diana: células tumorales Colo205
Célula T: células T CD8 específicas de CMVpp65
IFNγ (pg/mL)
150
100
50
0
+6%
+49%
+77%
+8%
hIgG4
CHA.7.518.1
TIGIT
CHA.7.518.1 + TIGIT
PD-1

Figura 82A, 82B

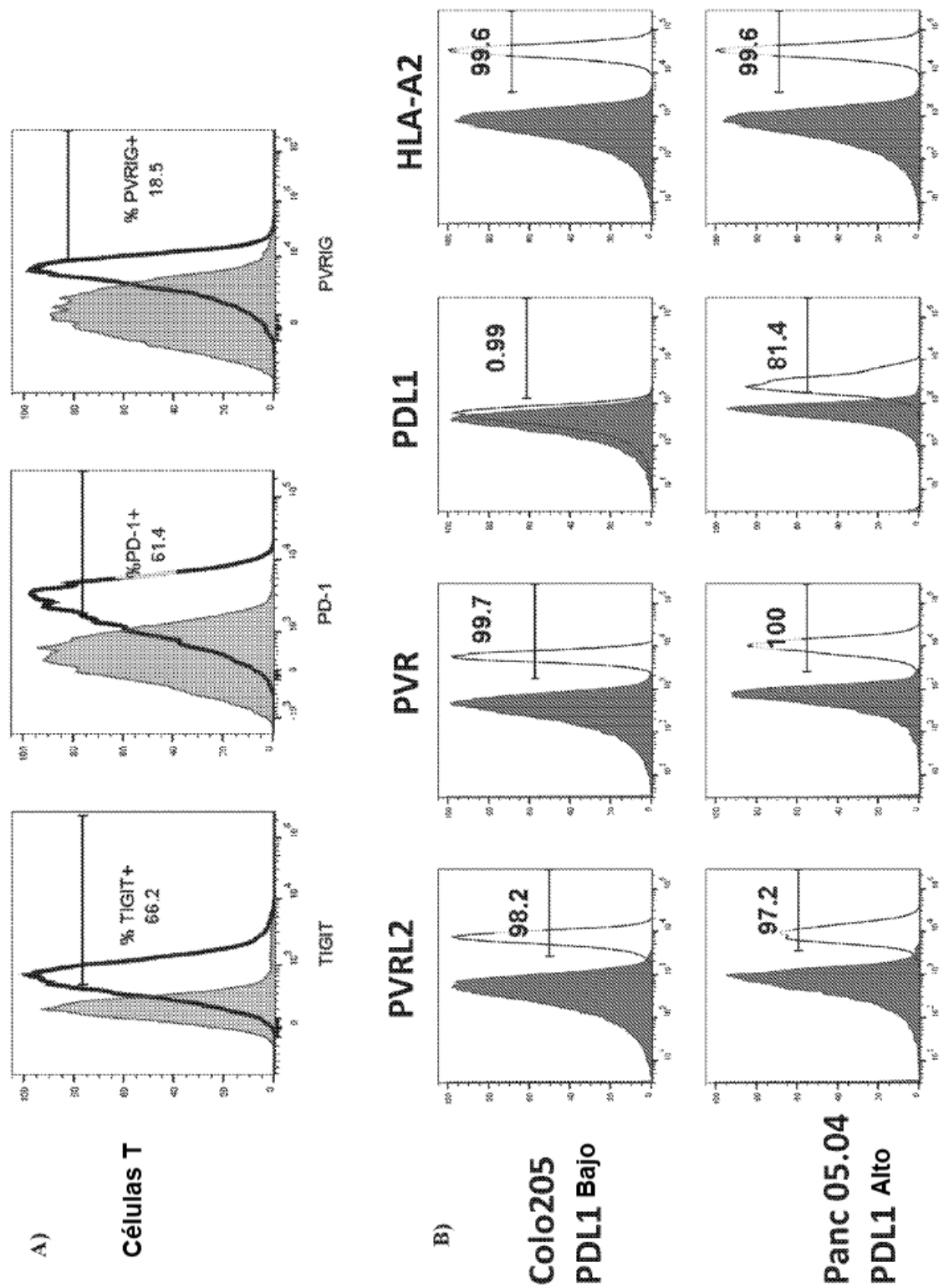


Figura 82C

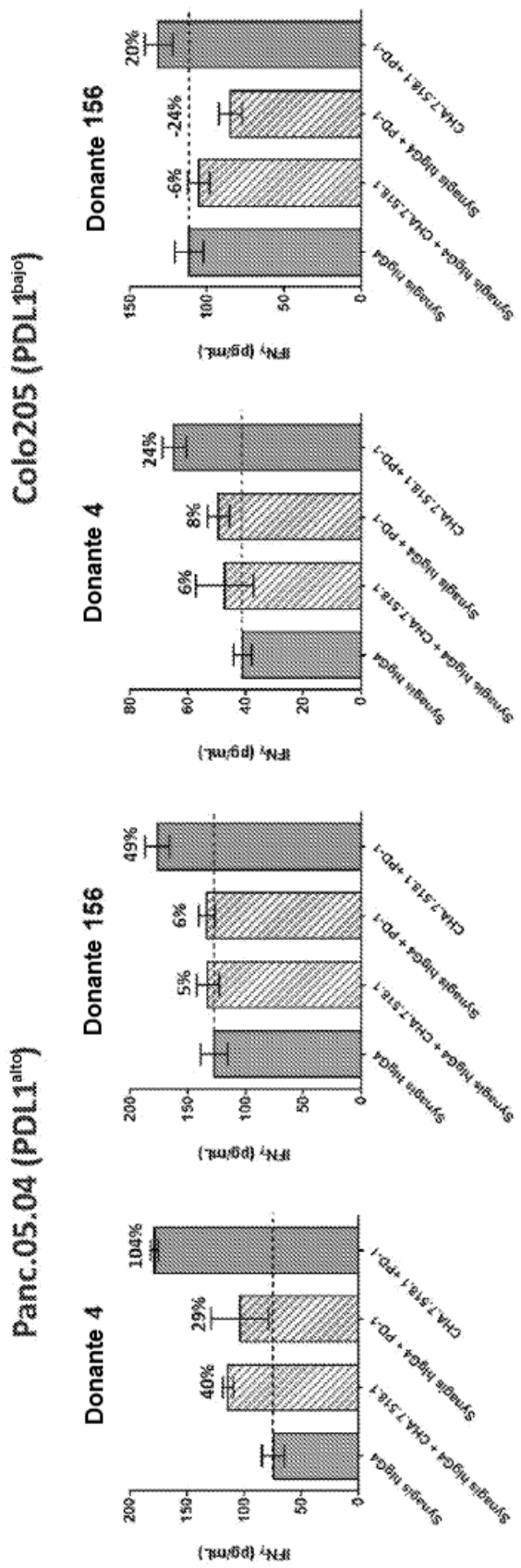

Panc.05.04 (PDL1alto)
Colo205 (PDL1bajo)
Donante 4
Donante 156
IFNγ (pg/mL)
Synagis hIgG4
Synagis hIgG4 + CHA.7.518.1
Synagis hIgG4 + PD-1
CHA.7.518.1 +PD-1
104%
40%
29%
49%
5%
6%
24%
6%
8%
20%
-6%
-24%

Figura 83

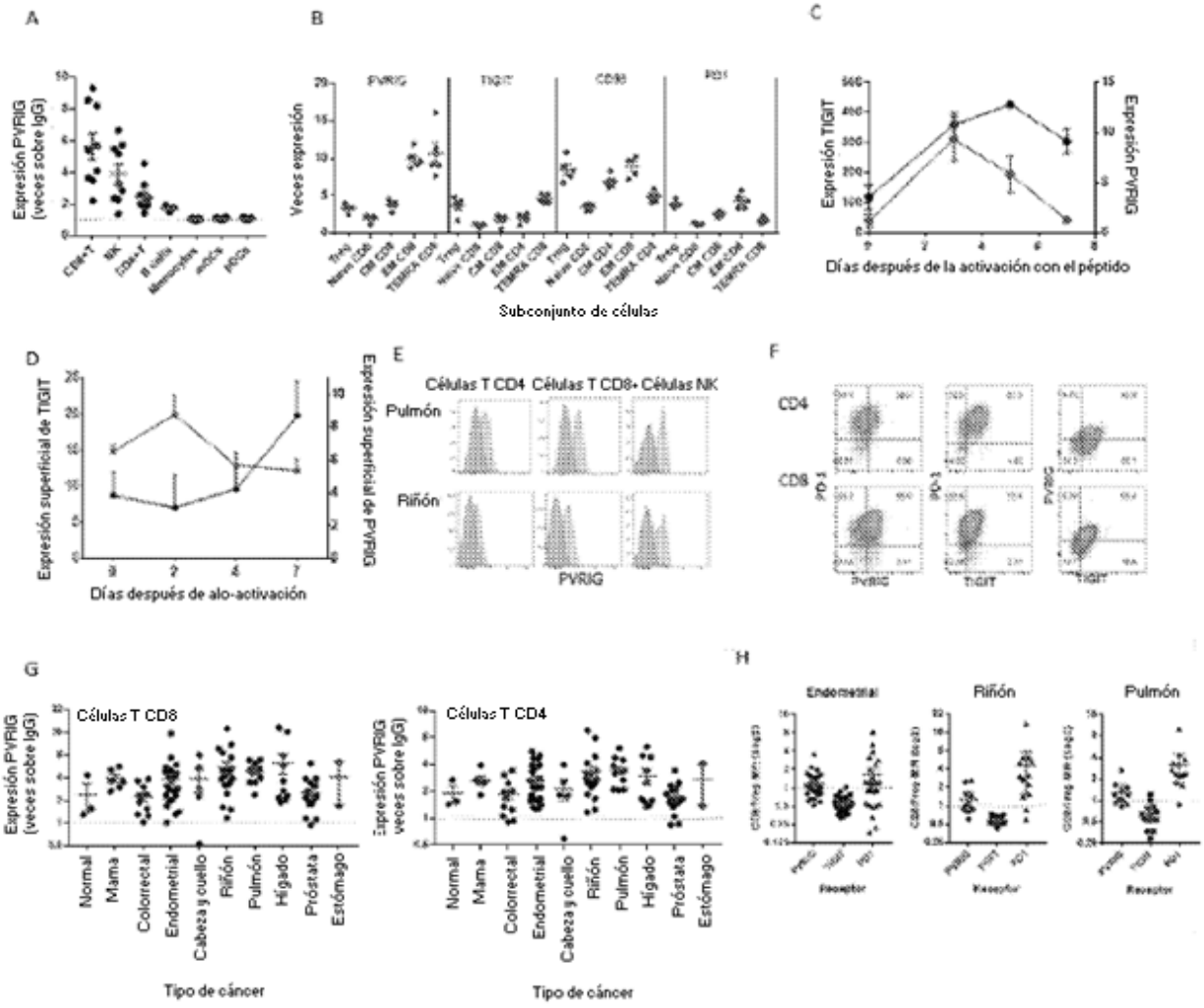

A
Expresión PVRIG (veces sobre IgG)
B
Veces expresión
PVRIG
TIGIT
CD96
PD1
Subconjunto de células
C
Expresión TIGIT
Expresión PVRIG
Días después de la activación con el péptido
D
Expresión superficial de TIGIT
Días después de alo-activación
E
Células T CD4
Células T CD8+
Células NK
Pulmón
Riñón
Expresión superficial de PVRIG
PVRIG
F
CD4
CD8
PD-1
PVRIG
TIGIT
G
Células T CD8
Células T CD4
Expresión PVRIG (veces sobre IgG)
Normal
Mama
Colorrectal
Endometrial
Cabeza y cuello
Riñón
Pulmón
Hígado
Próstata
Estómago
Tipo de cáncer
H
Endometrial
Riñón
Pulmón
Receptor

Figura 84

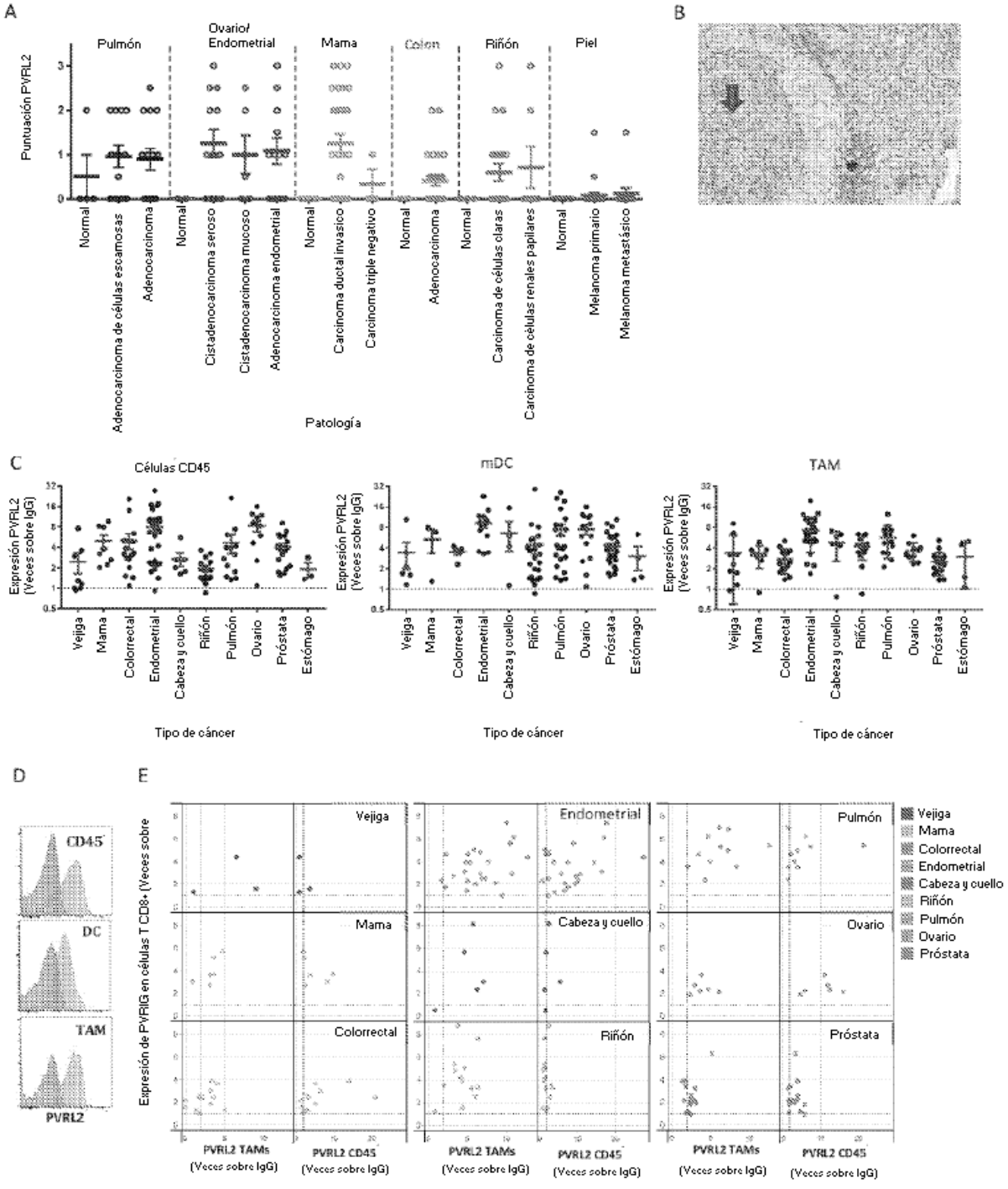

A
Pulmón
Ovario/ Endometrial
Mama
Colon
Riñón
Piel
Puntuación PVRL2
Normal
Adenocarcinoma de células escamosas
Adenocarcinoma
Cistadenocarcinoma seroso
Cistadenocarcinoma mucoso
Adenocarcinoma endometrial
Carcinoma ductal invasivo
Carcinoma triple negativo
Carcinoma de células claras
Carcinoma de células renales papilares
Melanoma primario
Melanoma metastásico
Patología
B
C
Células CD45
mDC
TAM
Expresión PVRL2 (Veces sobre IgG)
Vejiga
Mama
Colorrectal
Endometrial
Cabeza y cuello
Riñón
Pulmón
Ovario
Próstata
Estómago
Tipo de cáncer
D
CD45
DC
TAM
PVRL2
E
Expresión de PVRIG en células T CD8+ (Veces sobre
PVRL2 TAMs (Veces sobre IgG)
PVRL2 CD45 (Veces sobre IgG)

Figura 84F

	Todos los tumores			PD-L1+			PD-L1-		
Tipo de tejido	PVRL2+	Total	% Positive	PVRL2+	Total	%Positivos	PVRL2+	Total	%Positivos
Pulmón									
Normal	1	4	25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Adenocarcinoma	8	14	57	3	5	60	5	9	56
Carcinoma de células escamosas	8	13	62	5	7	71	3	6	50
Ovario									
Normal	0	2	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Cistadenocarcinoma seroso	8	12	67	2	3	67	6	9	67
Cistadenocarcinoma mucinoso	4	6	67	1	1	100	3	5	60
Adenocarcinoma endometrial	8	12	67	3	4	75	5	8	63
Colon									
Normal	0	2	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Adenocarcinoma	16	30	53	8	14	57	7	16	44
Piel									
Normal	0	4	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Melanoma primario	3	24	13	1	4	25	2	20	10
Melanoma metastásico	1	12	8	1	4	25	0	8	0
Mama									
Normal	0	3	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Carcinoma de células claras	8	20	40	0	0	N/A	8	20	40
Carcinoma de células renales papilares	2	7	29	1	1	100	1	6	17
Mama									
TNBC	1	3	33	0	0	N/A	1	3	33
Carcinoma ductal invasivo	19	30	63	6	10	60	13	20	65

Figura 85

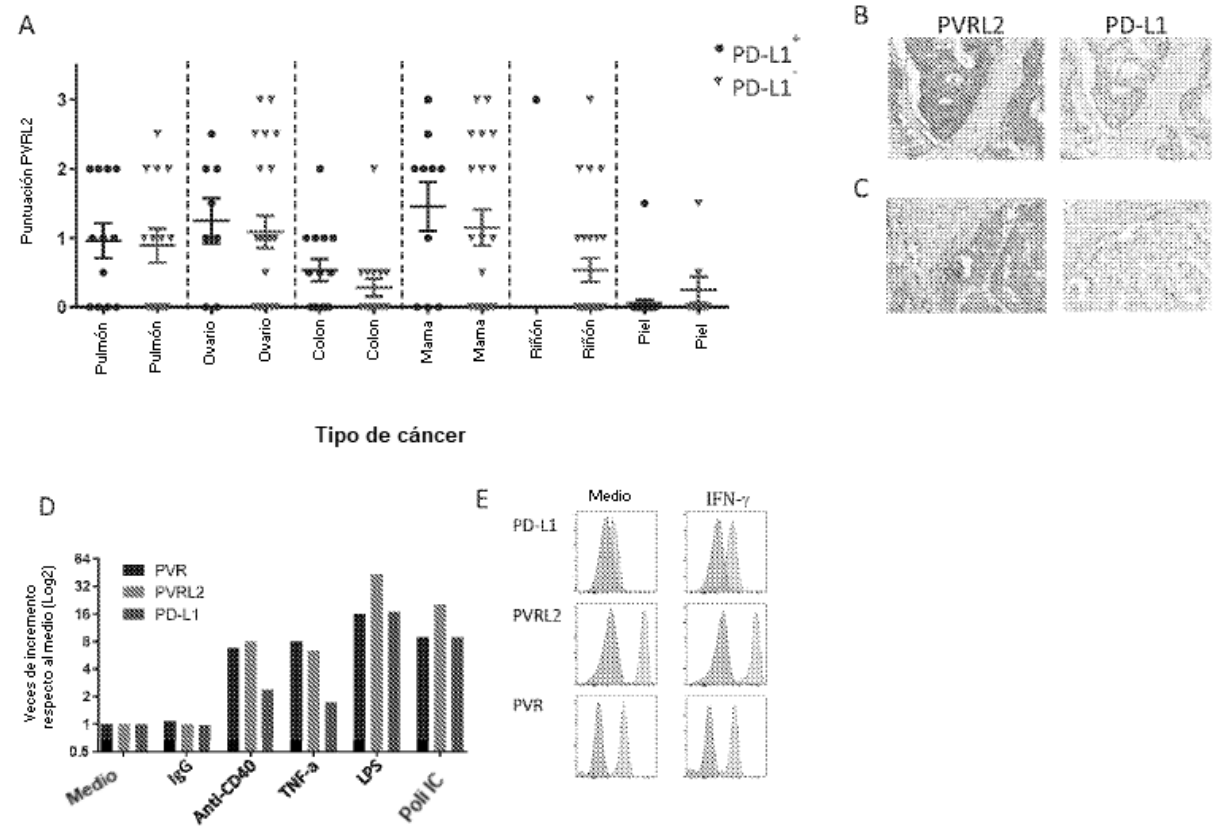
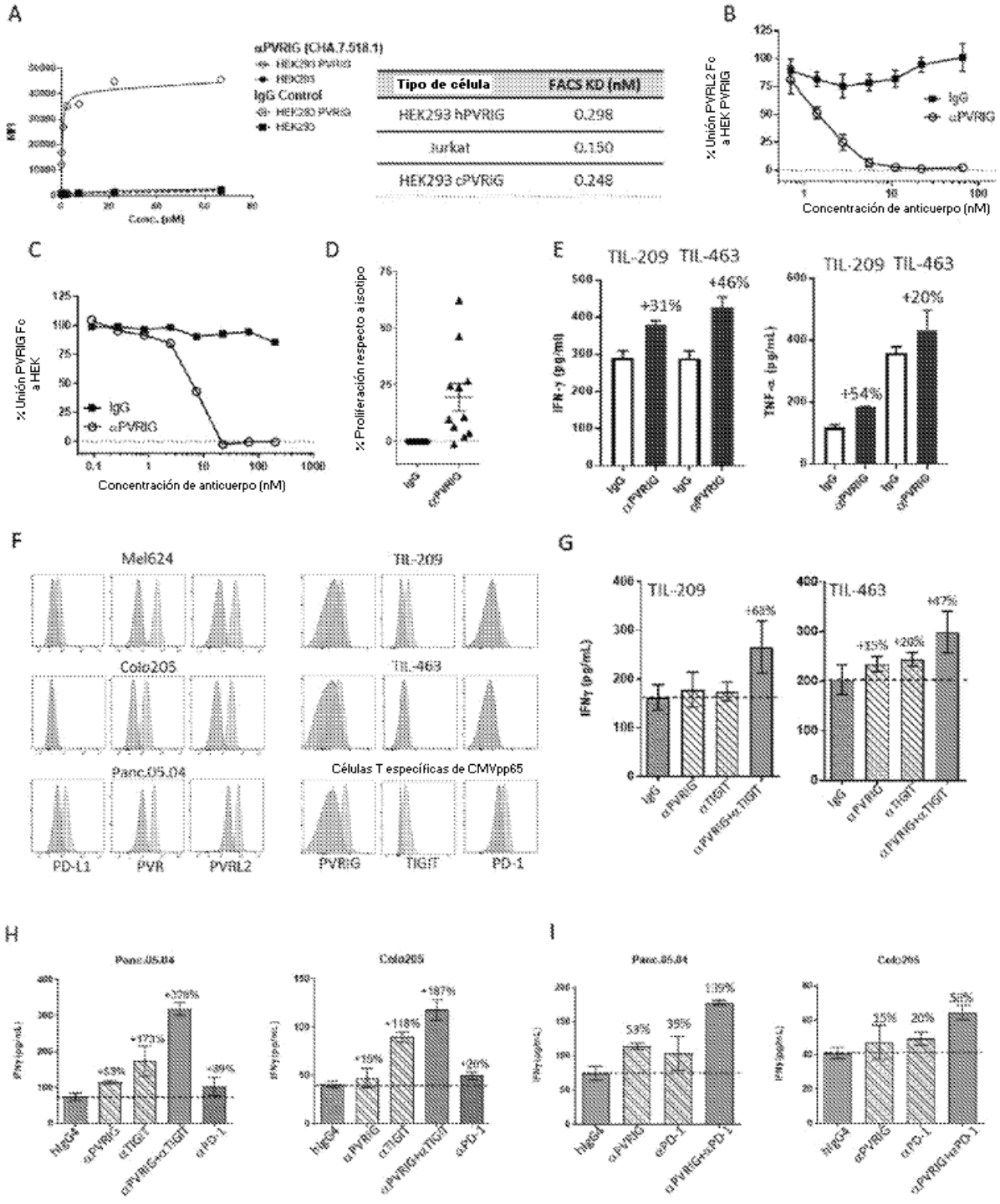

A
PD-L1+
PD-L1-
Puntuación PVRL2
Pulmón
Ovario
Colon
Mama
Riñón
Piel
Tipo de cáncer
B
PVRL2
PD-L1
C
D
PVR
PVRL2
PD-L1
Veces de incremento respecto al medio (Log2)
Medio
IgG
Anti-CD40
TNF-a
LPS
Poli IC
E
Medio
IFN-γ
PD-L1
PVRL2
PVR

Figura 86



Tipo de célula	FACS KD (nM)
HEK293 hPVRIG	0.298
Jurkat	0.150
HEK293 cPVRIG	0.248

Figura 87

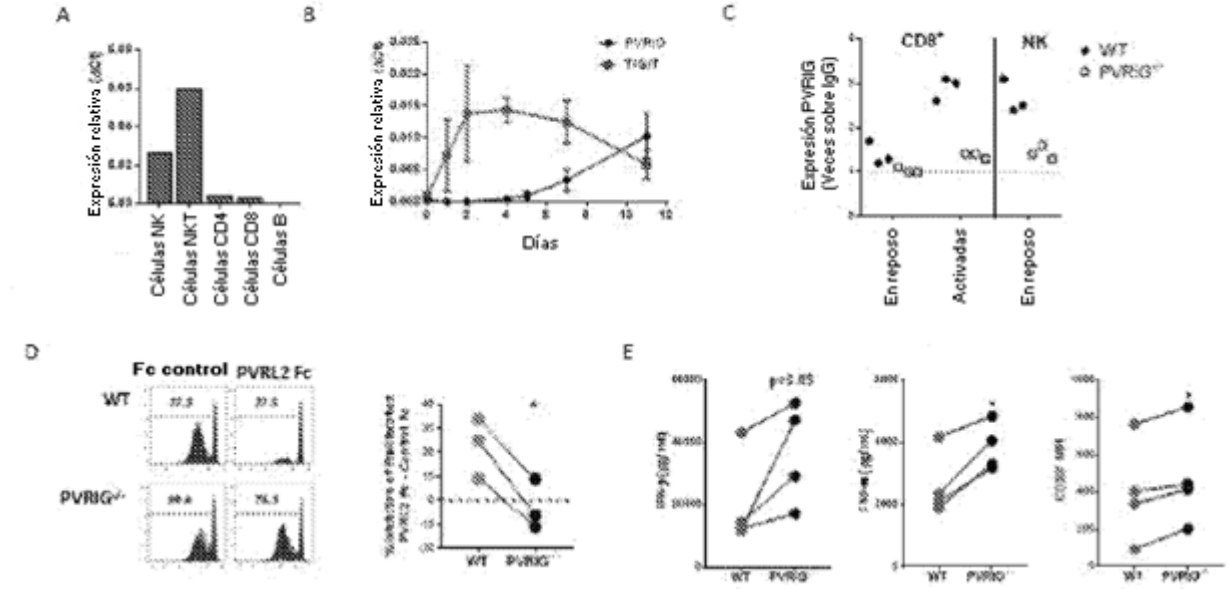

A
B
C
Expresión relativa (ΔΔCt)
Células NK
Células NKT
Células CD4
Células CD8
Células B
Días
CD8+
NK
WT
PVRIG-/-
Expresión PVRIG (Veces sobre IgG)
En reposo
Activadas
En reposo
D
Fc control
PVRL2 Fc
WT
PVRIG-/-
E
p=0.05
WT
PVRIG-/-

Figura 88

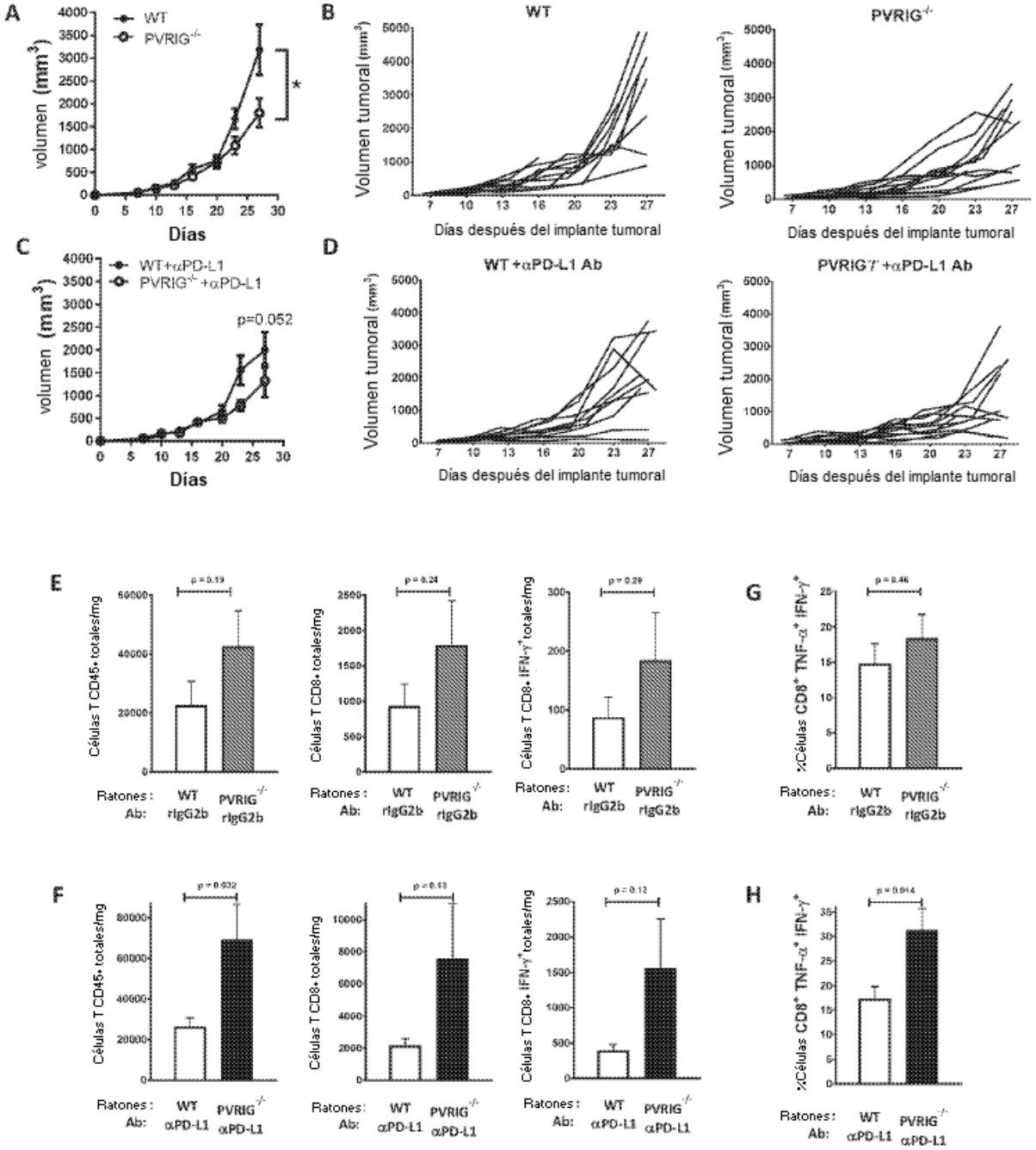

A
WT
PVRIG-/-
volumen (mm3)
Días
*
B
WT
PVRIG-/-
Volumen tumoral (mm3)
Días después del implante tumoral
C
WT+αPD-L1
PVRIG-/-+αPD-L1
p=0.052
volumen (mm3)
Días
D
WT +αPD-L1 Ab
PVRIG-/- +αPD-L1 Ab
Volumen tumoral (mm3)
Días después del implante tumoral
E
Células T CD45+ totales/mg
Células T CD8+ totales/mg
Células T CD8+ IFN-γ+ totales/mg
Ratones:
Ab:
WT
rIgG2b
PVRIG-/-
rIgG2b
G
%Células CD8+ TNF-α+ IFN-γ+
F
αPD-L1
H

Figura 89

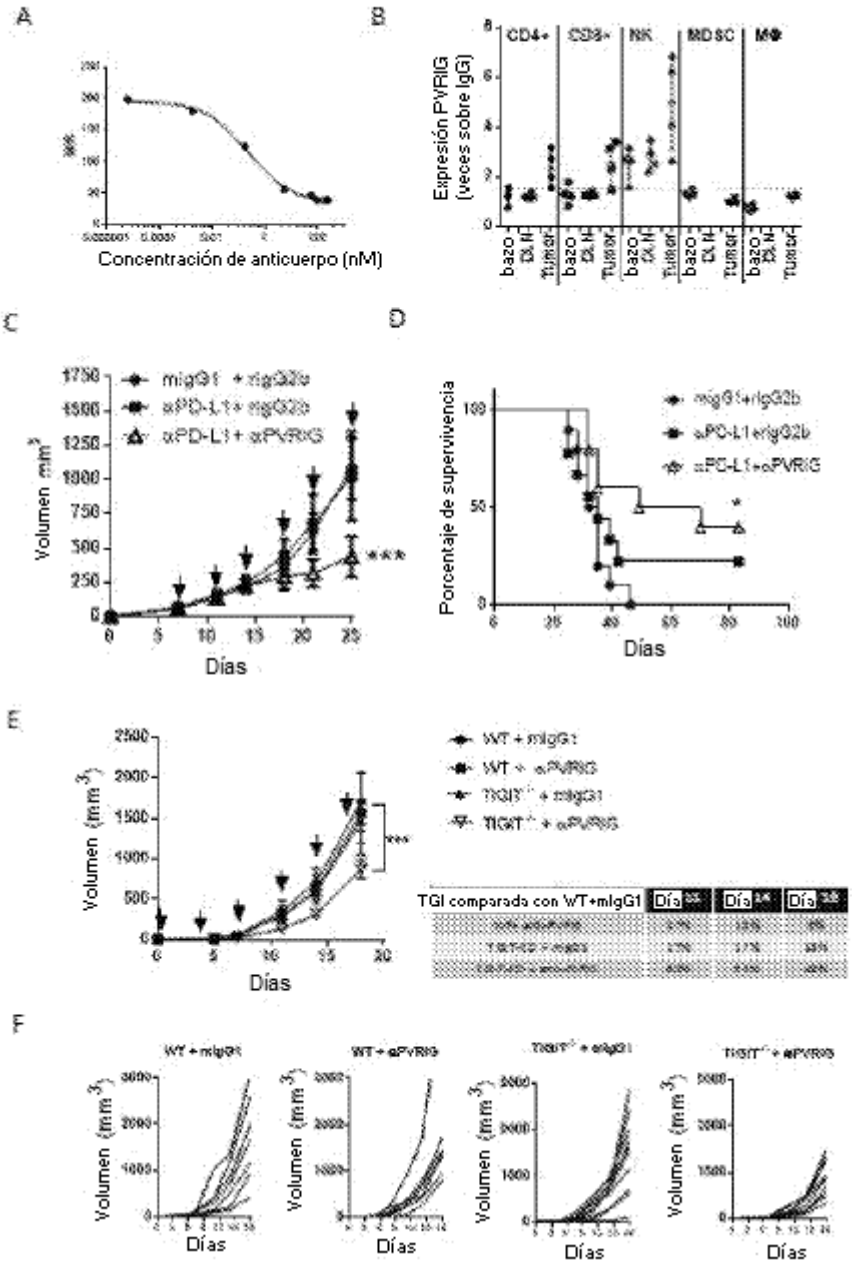

A
Concentración de anticuerpo (nM)
B
CD4+
CD8+
NK
MDSC
MΦ
Expresión PVRIG (veces sobre IgG)
bazo
GL N
Tumor
C
mIgG1 + rIgG2b
αPD-L1+ rIgG2b
αPD-L1+ αPVRIG
Volumen mm3
Días
***
D
mIgG1+rIgG2b
αPD-L1+rIgG2b
αPD-L1+αPVRIG
Porcentaje de supervivencia
Días
*
E
WT + mIgG1
WT + αPVRIG
TIGIT-/- + mIgG1
TIGIT-/- + αPVRIG
Volumen (mm3)
Días
***
TGI comparada con WT+mIgG1
Día 35
Día 44
Día 56
F
WT + mIgG1
WT + αPVRIG
TIGIT-/- + mIgG1
TIGIT-/- + αPVRIG
Volumen (mm3)
Días

Figura 90

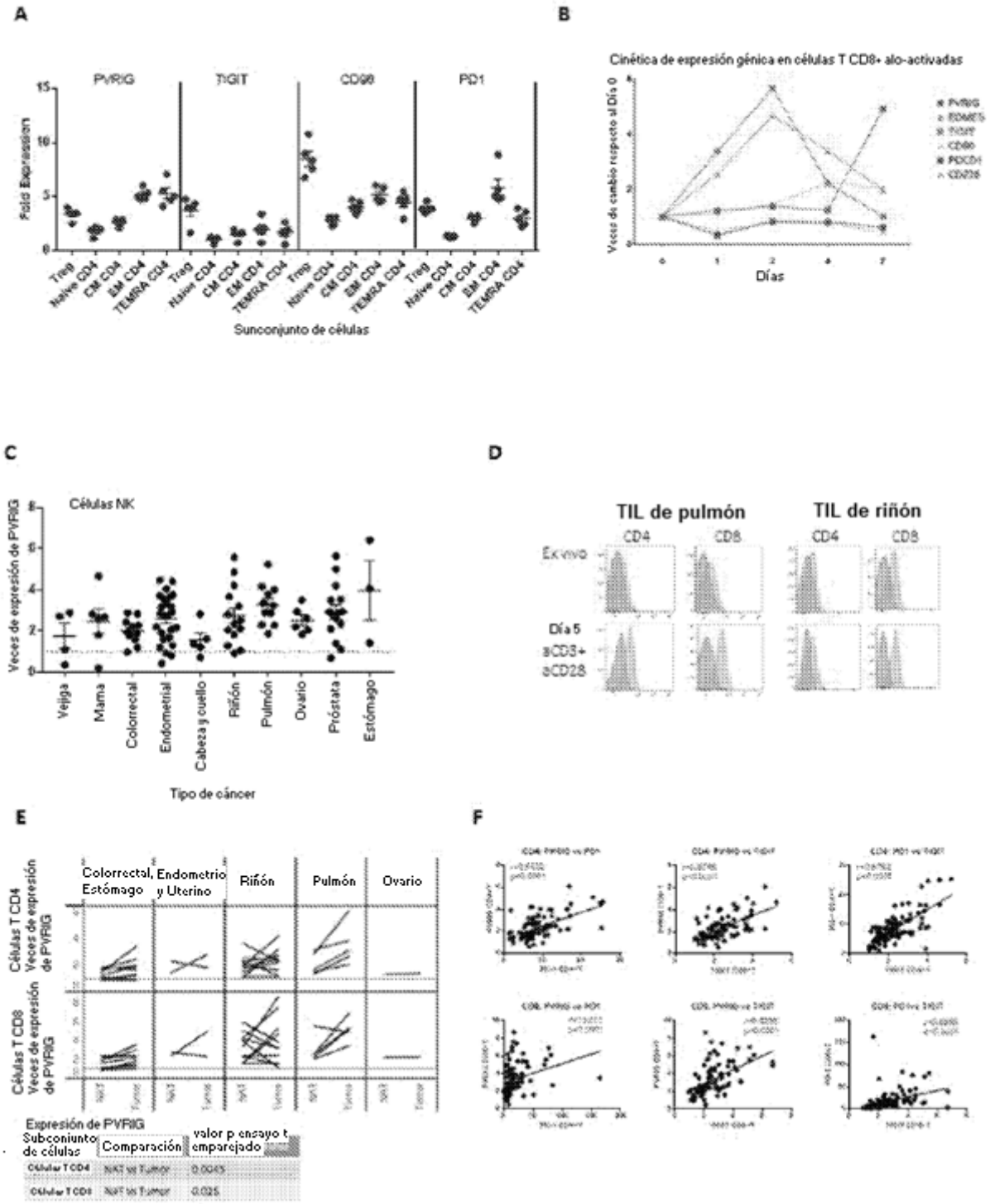
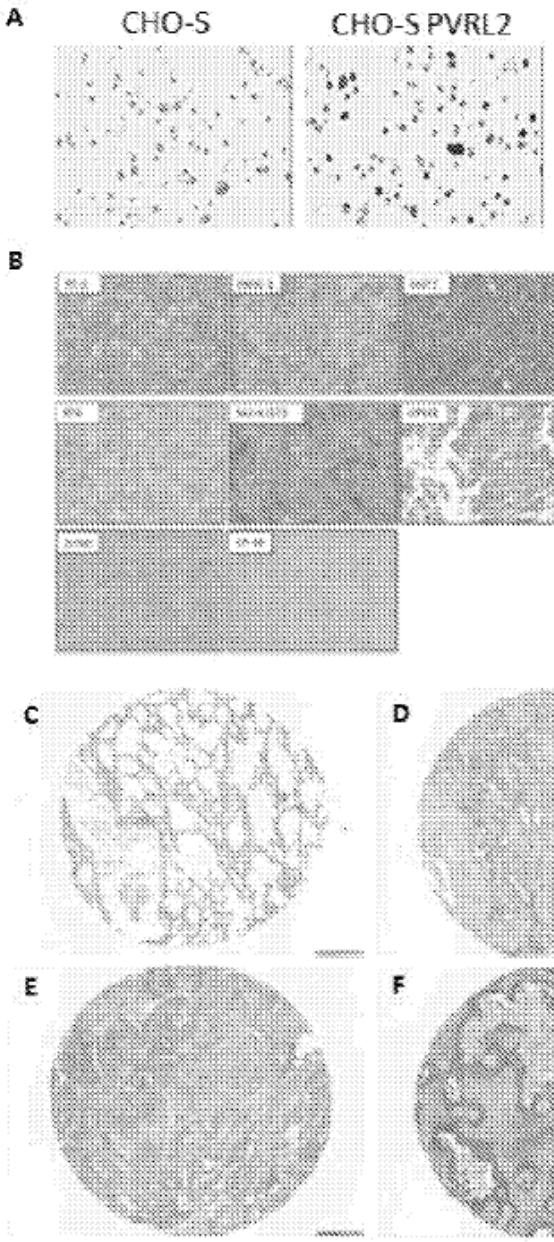
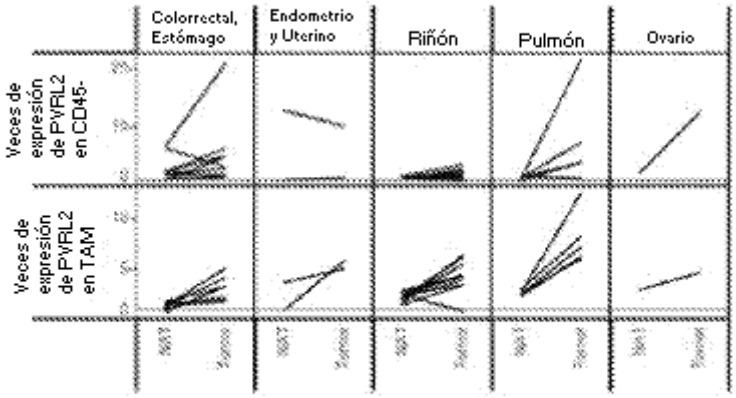

A
PVRIG
TIGIT
CD96
PD1
Fold Expression
Treg
Naive CD4
CM CD4
EM CD4
TEMRA CD4
Subconjunto de células
B
Cinética de expresión génica en células T CD8+ alo-activadas
Veces de cambio respecto al Día 0
Días
C
Células NK
Veces de expresión de PVRIG
Vejiga
Mama
Colorrectal
Endometrial
Cabeza y cuello
Riñón
Pulmón
Ovario
Próstata
Estómago
Tipo de cáncer
D
TIL de pulmón
TIL de riñón
CD4
CD8
Ex vivo
Día 5
aCD3+
aCD28
E
Células T CD4
Veces de expresión de PVRIG
Células T CD8
Veces de expresión de PVRIG
Colorrectal, Estómago
Endometrio y Uterino
Riñón
Pulmón
Ovario
Expresión de PVRIG
Subconjunto de células
Comparación
valor p ensayo t emparejado
Celular TCD4
NAT vs Tumor
0.0045
Celular TCD8
NAT vs Tumor
0.025
F

Figura 91



Línea celular	Expresión de PVRL2 por FACS
PC-3	+
PANC-1	+
MCF7	+
HT-29	+
RT-4	+
NCI-H1573	+
OPM2	-
Daudi	-
Jurkat	-
CA-46	-

Figura 92



Expresión de PVRL2

Subconjunto de células	Comparación	valor p ensayo t emparejado
CD45-	[illegible]	[illegible]
Monocitos	[illegible]	[illegible]

Figura 93

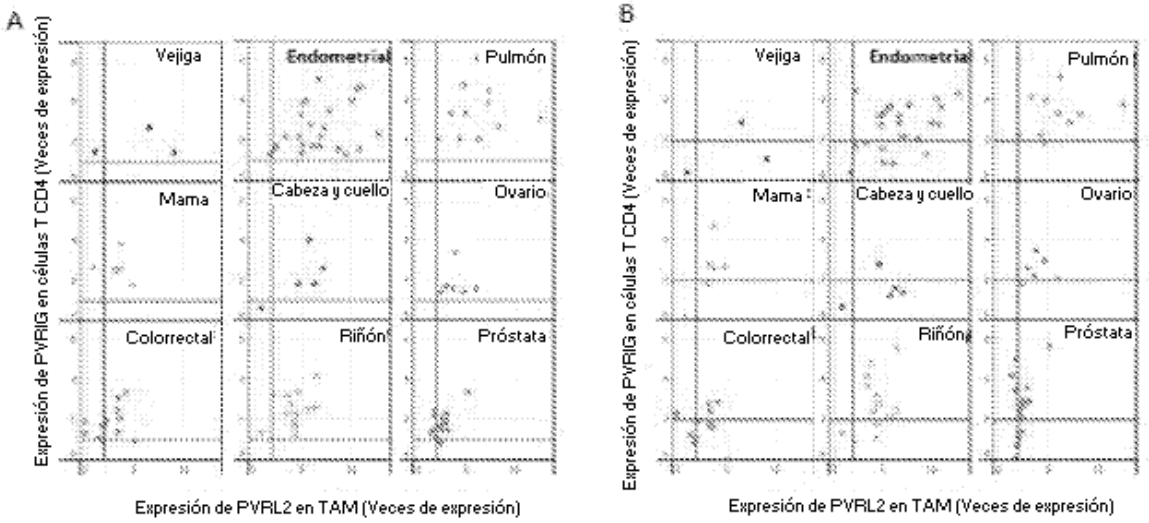

A
Vejiga
Endometrial
Pulmón
Mama
Cabeza y cuello
Ovario
Colorrectal
Riñón
Próstata
Expresión de PVRIG en células T CD4 (Veces de expresión)
Expresión de PVRL2 en TAM (Veces de expresión)
B
Vejiga
Endometrial
Pulmón
Mama
Cabeza y cuello
Ovario
Colorrectal
Riñón
Próstata
Expresión de PVRIG en células T CD4 (Veces de expresión)
Expresión de PVRL2 en TAM (Veces de expresión)

Figura 94

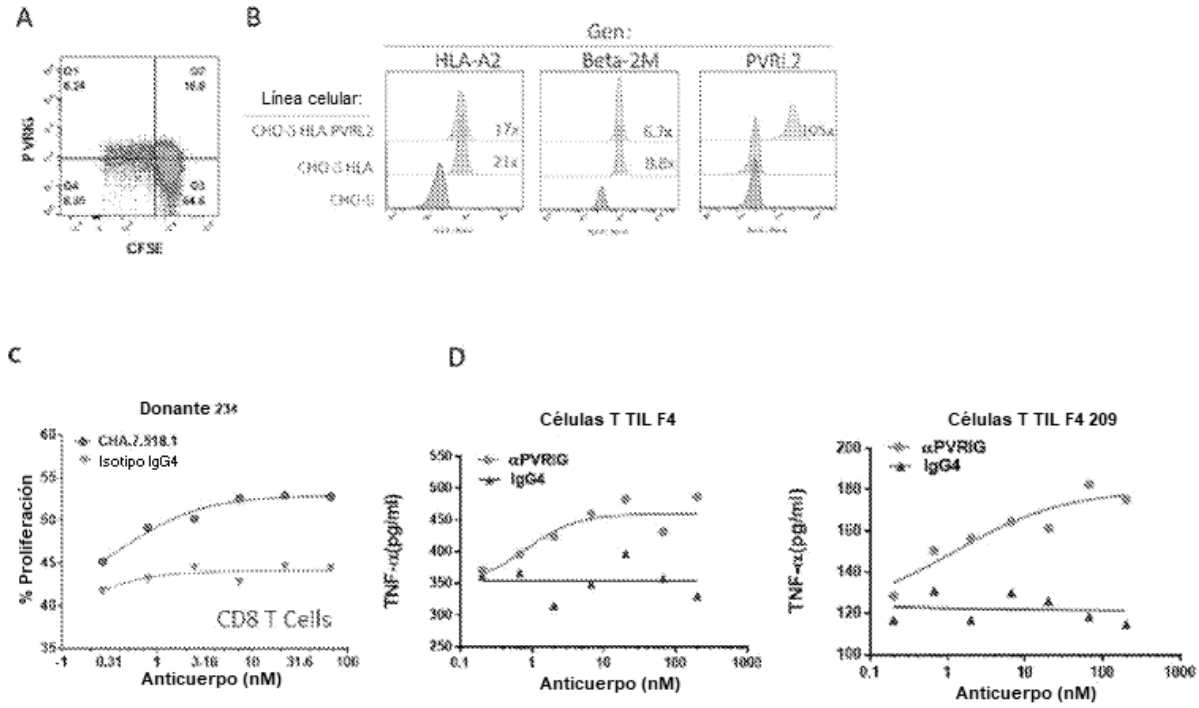

A
B
Gen:
HLA-A2
Beta-2M
PVRL2
Línea celular:
CHO-S HLA PVRL2
CHO-S HLA
CHO-S
PVRIG
CFSE
C
D
Donante 234
CHA.2.518.1
Isotipo IgG4
% Proliferación
CD8 T Cells
Anticuerpo (nM)
Células T TIL F4
αPVRIG
IgG4
TNF-α(pg/ml)
Anticuerpo (nM)
Células T TIL F4 209
αPVRIG
IgG4
TNF-α(pg/ml)
Anticuerpo (nM)

Figura 95

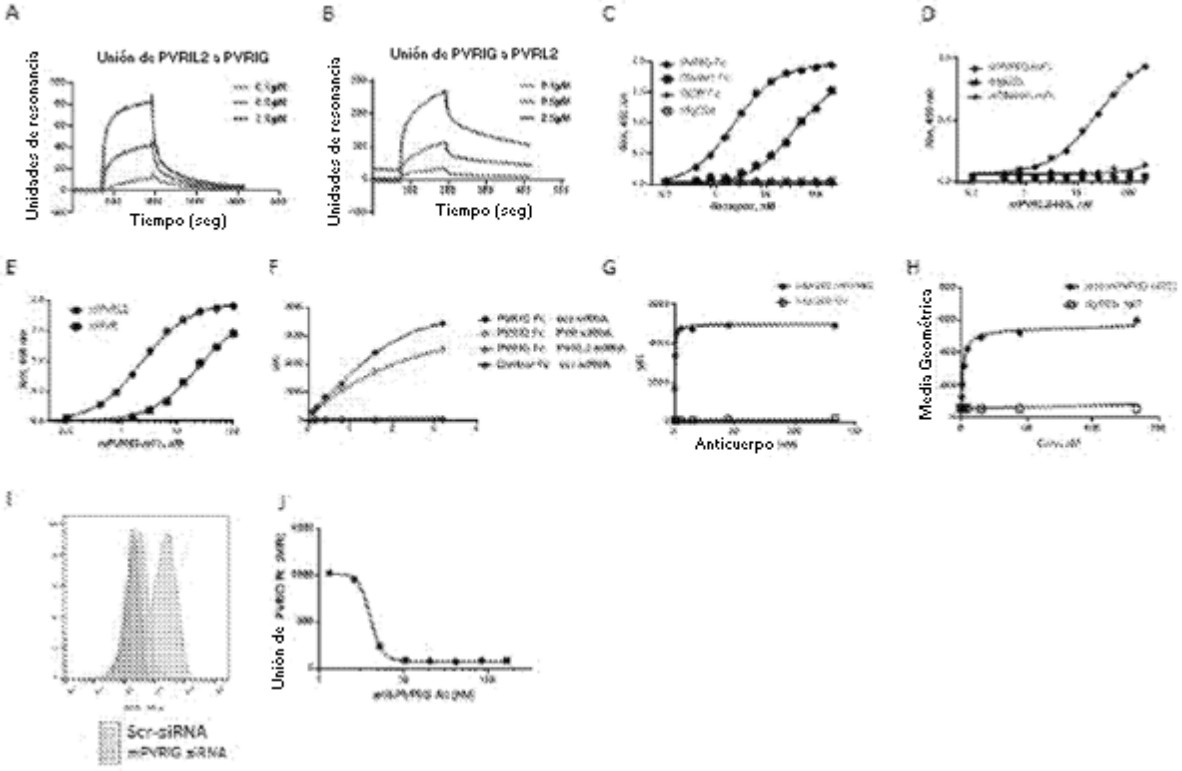

A
Unión de PVRIL2 a PVRIG
Unidades de resonancia
Tiempo (seg)
B
Unión de PVRIG a PVRL2
Unidades de resonancia
Tiempo (seg)
C
D
E
F
G
Anticuerpo
H
Media Geométrica
I
Scr-siRNA
mPVRIG siRNA
J

Figura 96

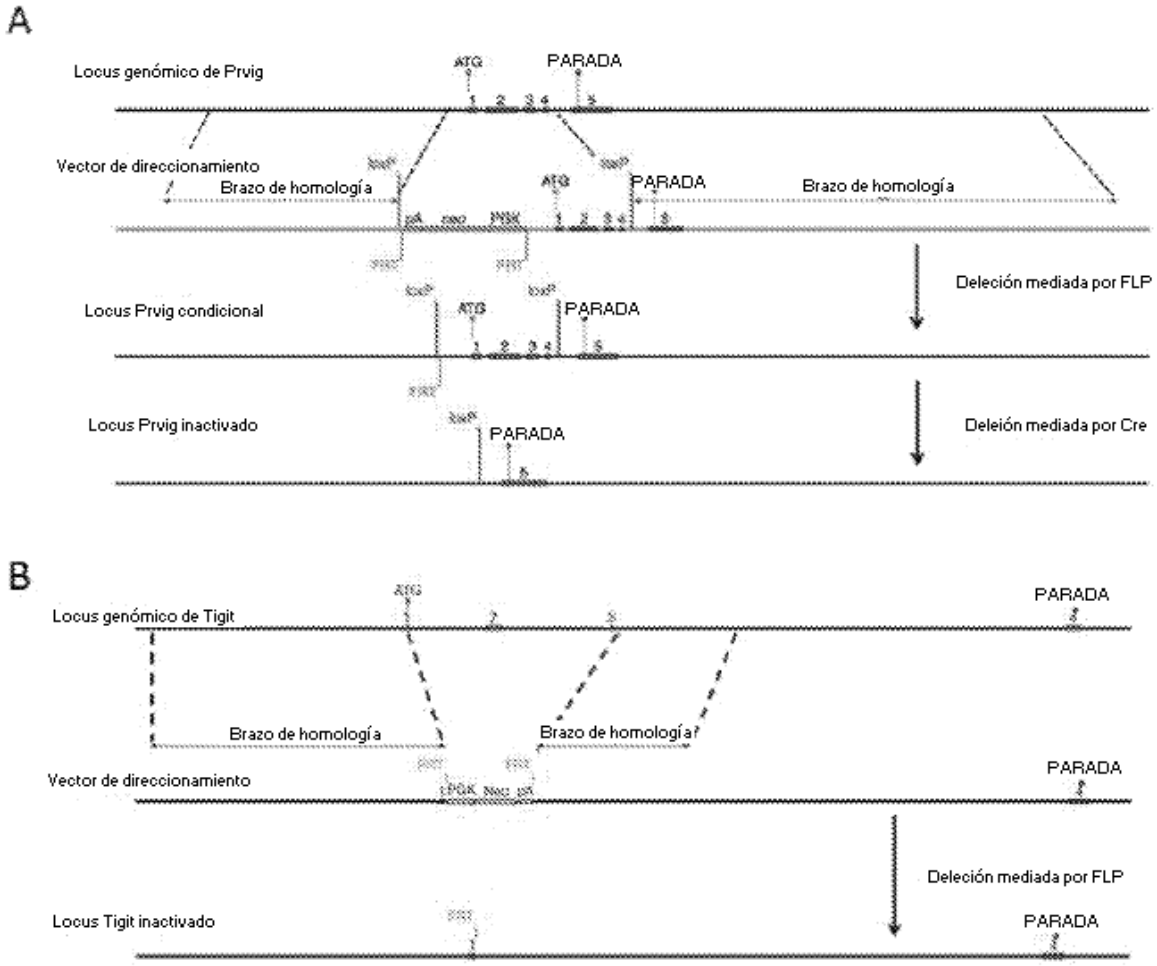

A
Locus genómico de Prvig
ATG
PARADA
Vector de direccionamiento
Brazo de homología
ATG
PARADA
Brazo de homología
Deleción mediada por FLP
Locus Prvig condicional
ATG
PARADA
Locus Prvig inactivado
PARADA
Deleión mediada por Cre
B
Locus genómico de Tigit
PARADA
Brazo de homología
Brazo de homología
Vector de direccionamiento
PARADA
Deleción mediada por FLP
Locus Tigit inactivado
PARADA

Figura 97

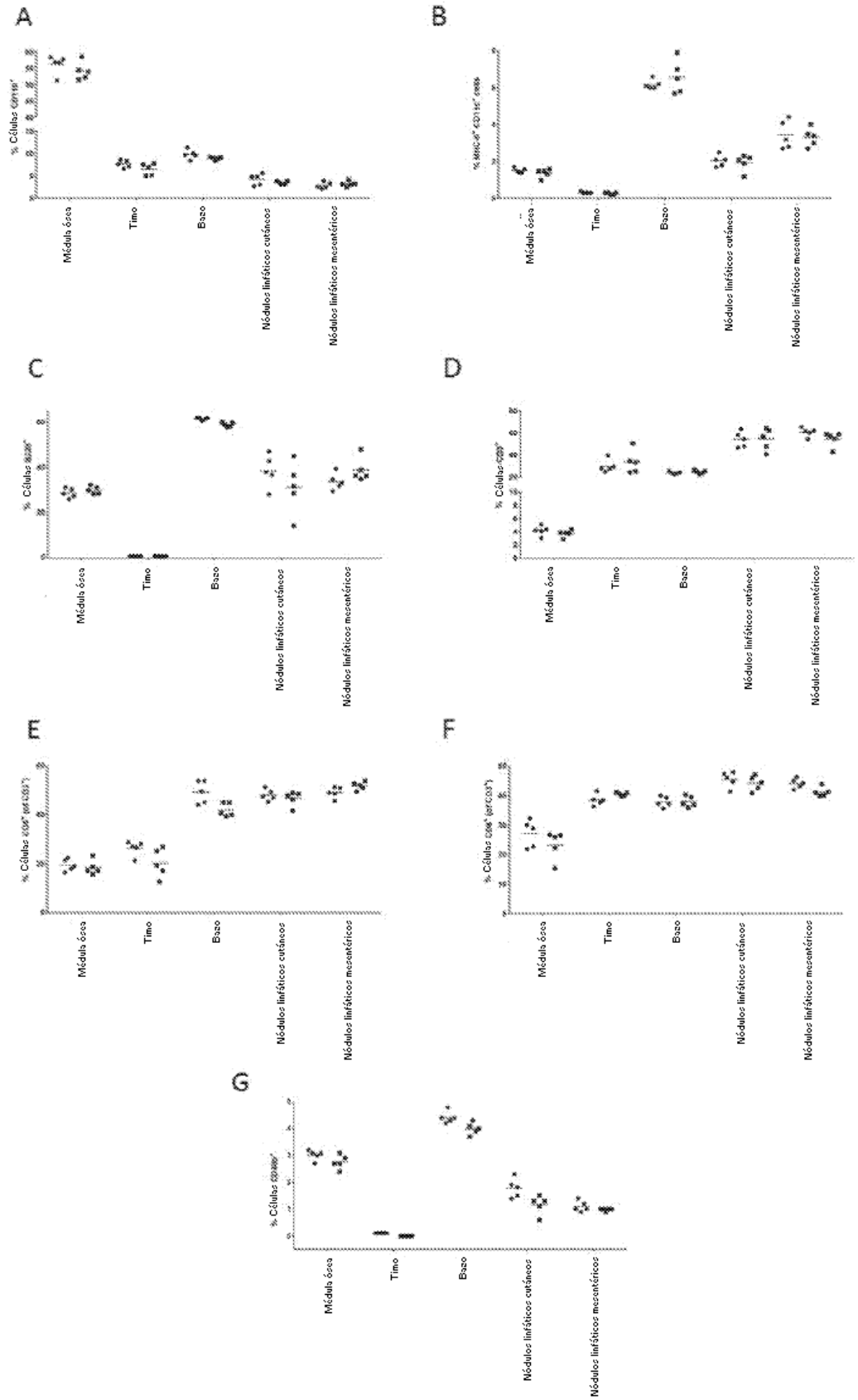
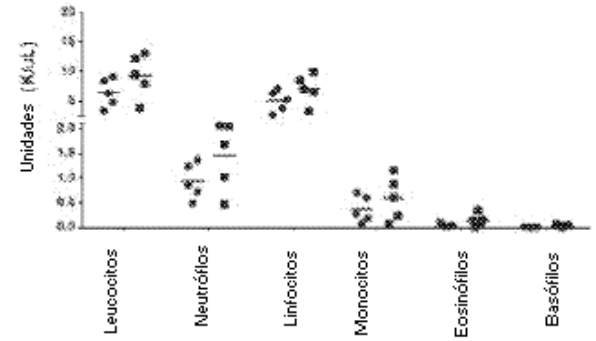

A
B
C
D
E
F
G
Médula ósea
Timo
Bazo
Nódulos linfáticos cutáneos
Nódulos linfáticos mesentéricos

Figura 97 (cont.)

H



I

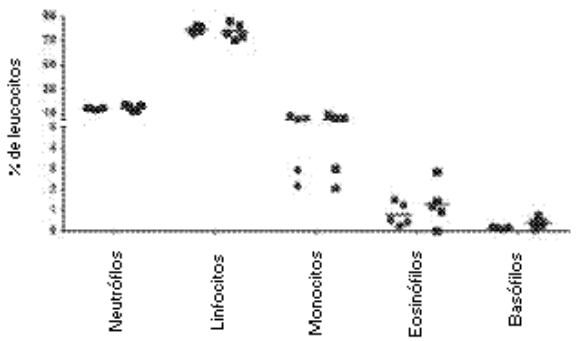


Figura 98

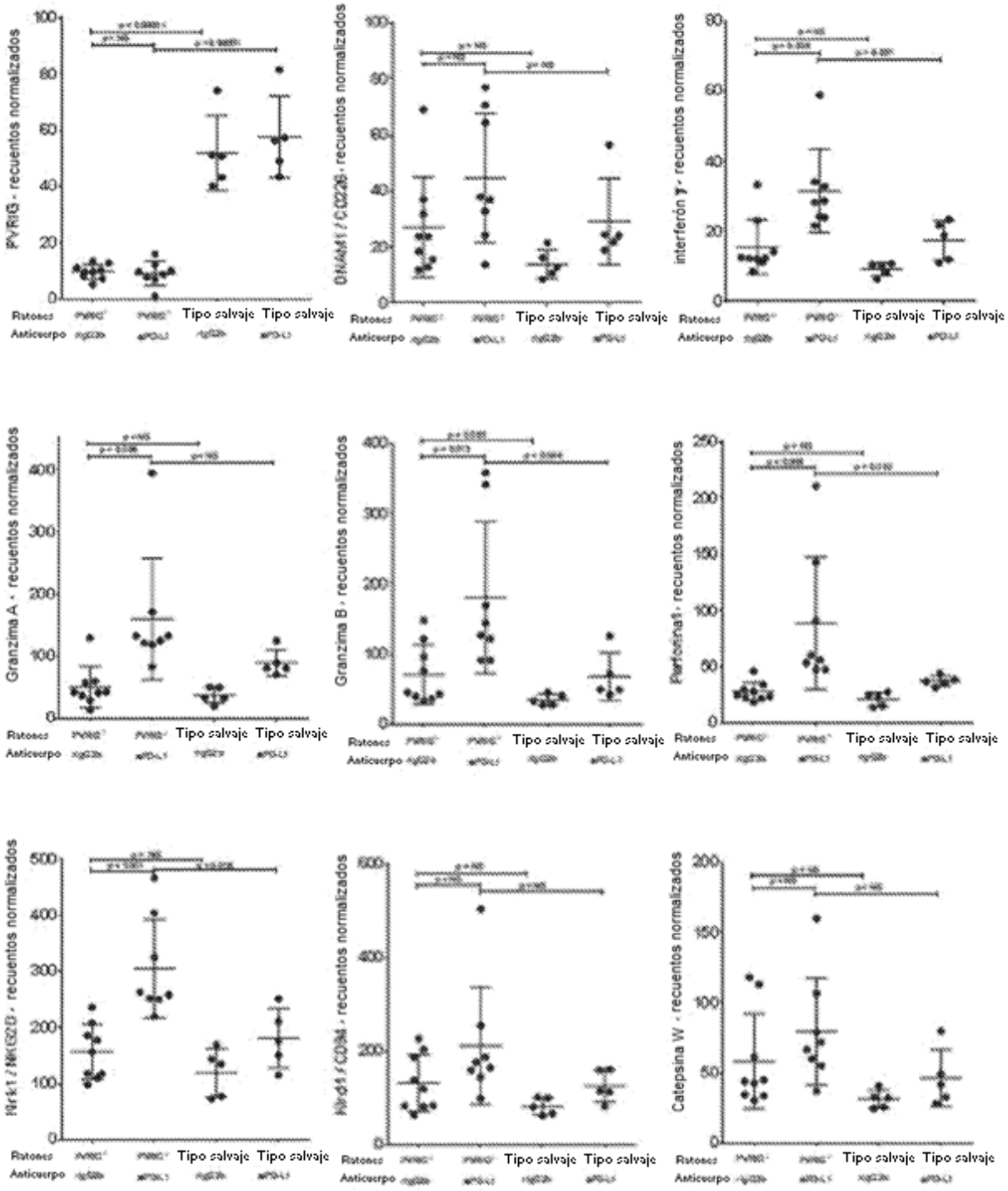

PVRIG - recuentos normalizados
DNAM1 / CD226 - recuentos normalizados
interferón γ - recuentos normalizados
Granzima A - recuentos normalizados
Granzima B - recuentos normalizados
Perforina1 - recuentos normalizados
Nrk1 / NKG2D - recuentos normalizados
Nrk41 / CD94 - recuentos normalizados
Catepsina W - recuentos normalizados
Ratones
Anticuerpo
Tipo salvaje
Tipo salvaje

Figura 99

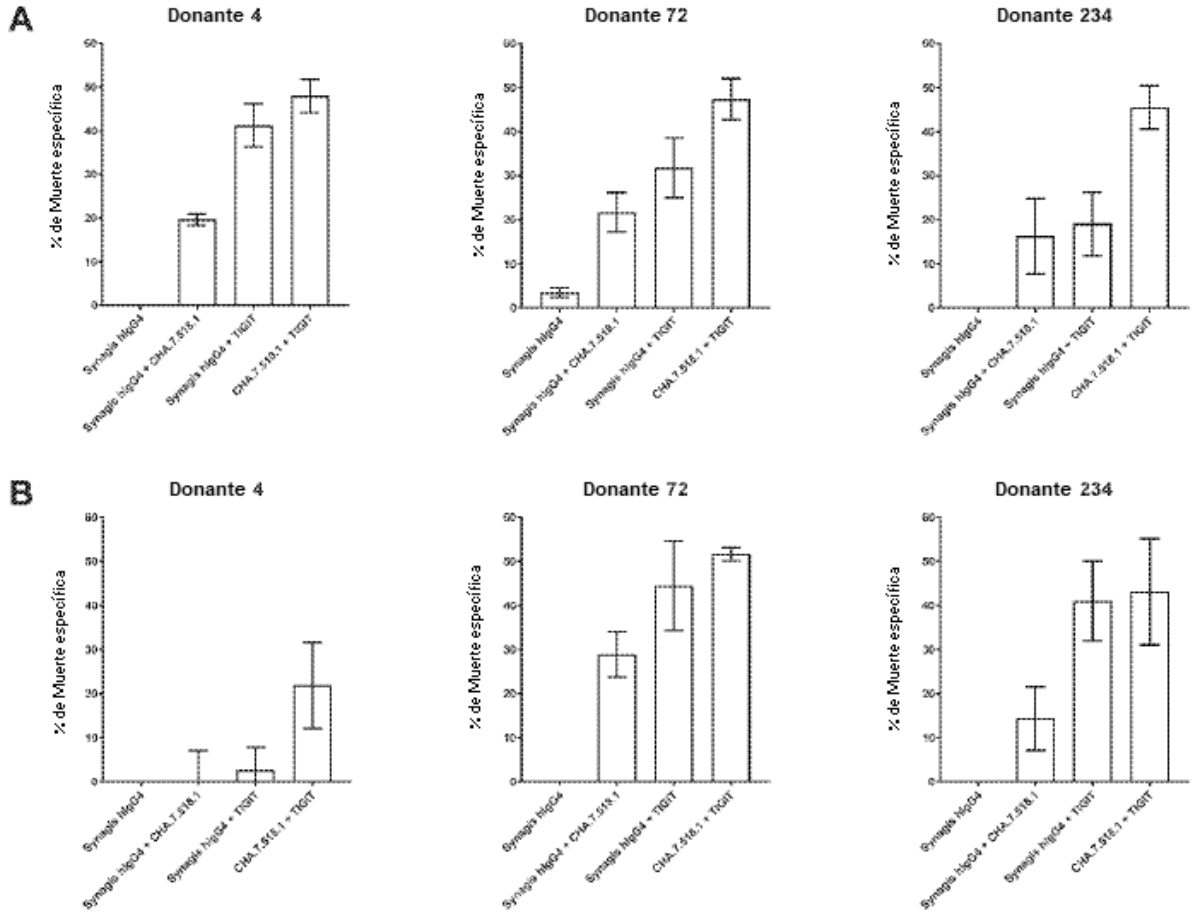

A
Donante 4
Donante 72
Donante 234
% de Muerte específica
Synagis hIgG4
Synagis hIgG4 + CHA.7.518.1
Synagis hIgG4 + TIGIT
CHA.7.518.1 + TIGIT
B
Donante 4
Donante 72
Donante 234
% de Muerte específica
Synagis hIgG4
Synagis hIgG4 + CHA.7.518.1
Synagis hIgG4 + TIGIT
CHA.7.518.1 + TIGIT

Figura 100

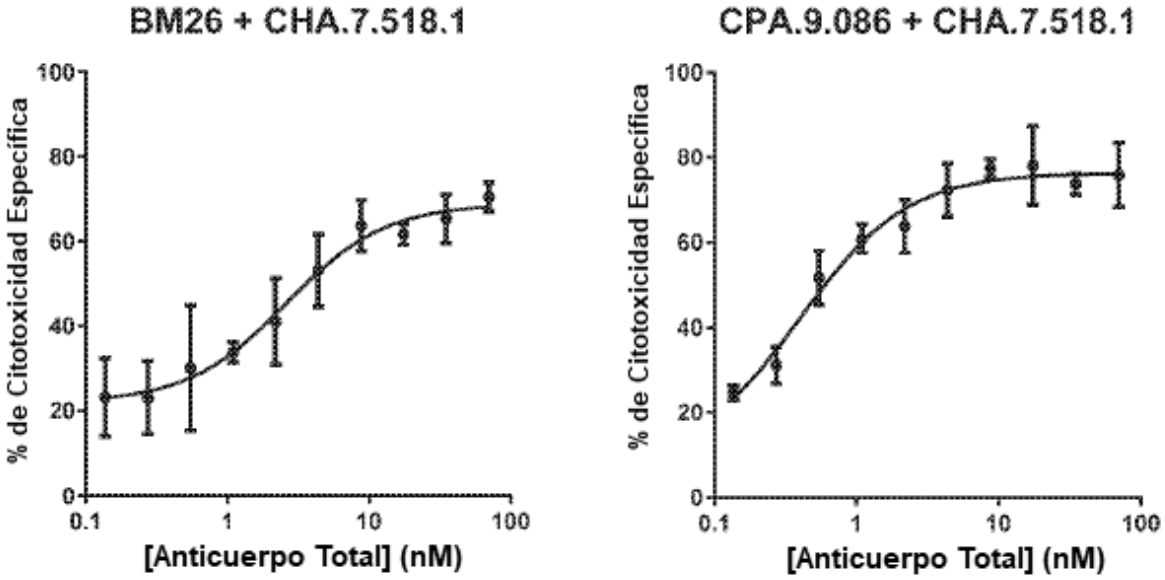
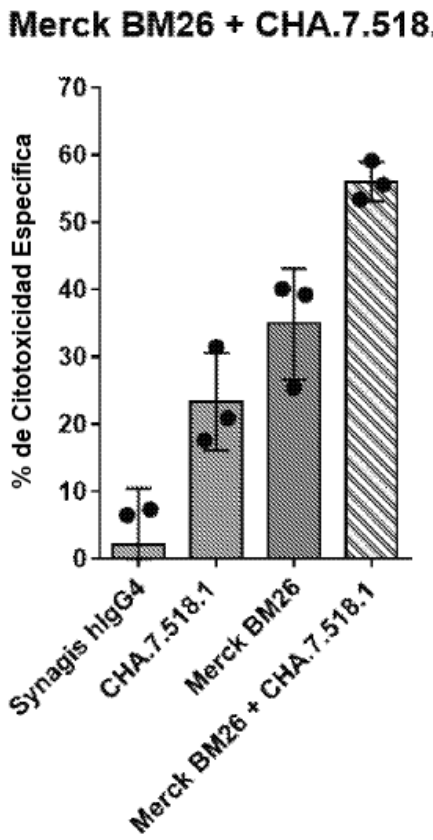

BM26 + CHA.7.518.1
% de Citotoxicidad Específica
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
[Anticuerpo Total] (nM)
CPA.9.086 + CHA.7.518.1
% de Citotoxicidad Específica
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
[Anticuerpo Total] (nM)

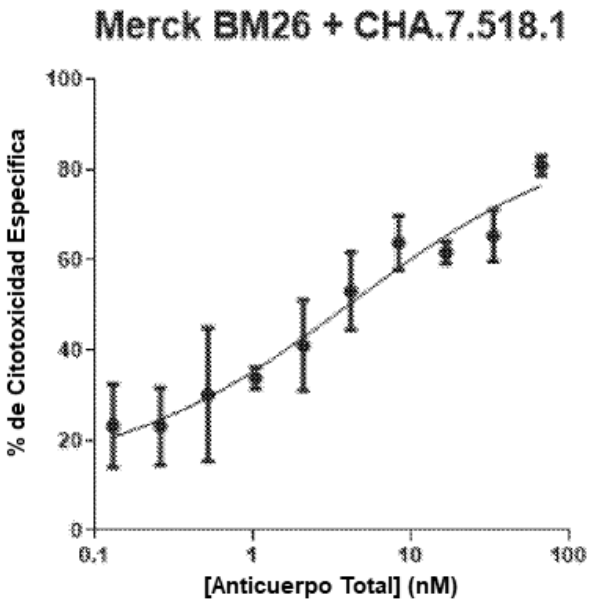
Figura 101

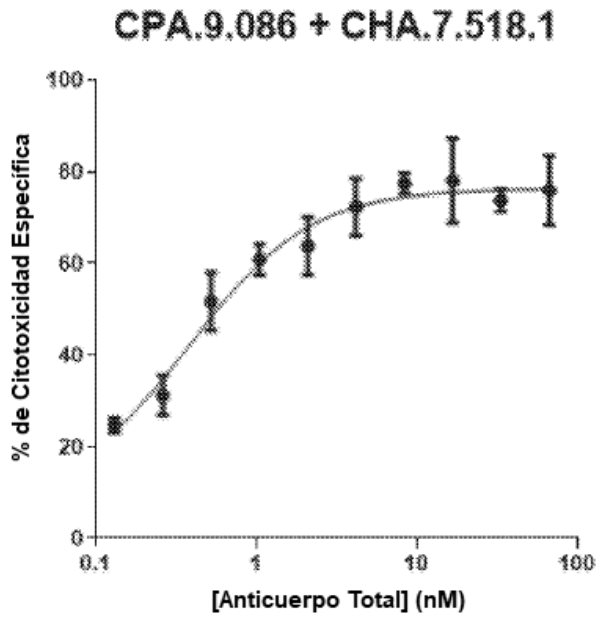
Secuencias de CDR de CPA9.086

Definición	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
IMGT	GFTFSSYA **(SEQ ID NO:600)**	ISYAGEVK **(SEQ ID NO:601)**	ARDPLPLHYYGMDV **(SEQ ID NO:602)**	SSNMGRRP **(SEQ ID NO:603)**	SQN **(SEQ ID NO:604)**	AVWDDIGRVLQ **(SEQ ID NO:605)**
Kabat	SYAMH **(SEQ ID NO:606)**	VISYAGEVKYYADSVKG **(SEQ ID NO:607)**	DPLPLHYYGMDV **(SEQ ID NO:608)**	SGSSSNMGRRPVN **(SEQ ID NO:609)**	SQNQRPS **(SEQ ID NO:610)**	AVWDDIGRVLQ **(SEQ ID NO:611)**

Figura 102


Merck BM26 + CHA.7.518.1
% de Citotoxicidad Especifica
70
60
50
40
30
20
10
0
Synagis hIgG4
CHA.7.518.1
Merck BM26
Merck BM26 + CHA.7.518.1


Merck BM26 + CHA.7.518.1
% de Citotoxicidad Especifica
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
[Anticuerpo Total] (nM)


CPA.9.086 + CHA.7.518.1
% de Citotoxicidad Especifica
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
[Anticuerpo Total] (nM)