(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 806 800**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2016 E 17192325 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3295951**

(54) Título: **Anticuerpos anti-PVRIG y métodos de uso**

(30) Prioridad:

19.02.2015 US 201562118208 P
31.03.2015 US 201562141120 P
01.10.2015 US 201562235823 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2021

(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.;
PRESTA, LEONARD y
THEOLIS, RICHARD

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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-PVRIG y métodos de uso

Antecedentes de la invención

Las células T vírgenes deben recibir dos señales independientes de células presentadoras de antígeno (APC) para activarse productivamente. La primera, Señal 1, es específica de antígeno y se produce cuando los receptores de antígeno de célula T encuentran el complejo antígeno-MHC apropiado sobre las APC. El destino de la respuesta inmune se determina mediante una segunda señal independiente de antígeno (Señal 2) que es proporcionada a través de una molécula coestimuladora de célula T que involucra su ligando expresado por APC. Esta segunda señal podría ser 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 células T se ve afectada o abortada, lo que puede conducir a un estado de falta de respuesta específica de antígeno (conocida como anergia de células T), o puede dar como resultado la muerte apoptótica de células T.

Los pares de moléculas coestimuladoras habitualmente consisten en ligandos expresados en APCs y sus receptores cognados expresados en células T. Los pares ligando/receptor prototipo de moléculas coestimuladoras son B7/CD28 y CD40/CD40L. La familia B7 consiste en ligandos proteínicos de superficie celular relacionados estructuralmente, que pueden proporcionar un aporte estimulador o inhibidor 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.

Las señales coestimuladoras tanto positivas como negativas desempeñan un papel crítico en la regulación de las respuestas inmunes mediadas celularmente, y las moléculas que median en dichas señales han demostrado ser dianas efectivas para la inmunomodulación. En base a este conocimiento, se han desarrollado varias estrategias terapéuticas que implican como dianas moléculas coestimuladoras, y han demostrado ser útiles para la prevención y el tratamiento de cáncer mediante la activación, o evitando la desactivación, de respuestas inmunes en pacientes de cáncer, y para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades autoinflamatorias, así como en el rechazo de trasplantes alogénicos, bien desactivando respuestas inmunes incontroladas, o mediante la inducción de “señal de apagado” por coestimulación negativa (o coinhibición) en sujetos con dichas condiciones patológicas.

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

Las rutas coestimuladoras desempeñan un papel importante en el desarrollo de tumores. Cabe destacar que los tumores han demostrado evadir la destrucción inmune impidiendo la activación de 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 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 por tumor se han convertido en biomarcadores de cáncer atractivos y pueden servir como antígenos asociados a tumor (TAAs). Adicionalmente, se han identificado rutas coestimuladoras como controles inmunológicos que atenúan respuestas inmunes dependientes de células T, tanto a nivel de función de inicio como de función efectora en las metástasis tumorales. A medida que las vacunas diseñadas contra el cáncer continúan mejorando, se hace cada vez más claro que dichos controles inmunológicos son una barrera principal en la capacidad de las vacunas para inducir respuestas anti-tumorales terapéuticas. A este respecto, las moléculas coestimuladoras pueden actuar como adyuvantes para inmunoterapia de cáncer activa (vacunación) y pasiva (mediada por anticuerpos), proporcionando estrategias que desbaraten la tolerancia inmune y estimulen el sistema inmunitario.

A lo largo de la última década, se han desarrollado agonistas y/o antagonistas de varias proteínas coestimuladoras para tratar las enfermedades autoinmunes, el rechazo a injerto, la alergia y el cáncer. Por ejemplo, CTLA4-Ig (Abatacept, Orencia®) ha sido aprobado para el tratamiento de RA, CTLA4-Ig mutado (Betalacept, Nulojix®), para la

prevención del rechazo de trasplante de riñón agudo y por el anticuerpo anti-CTLA4 (Ipilimumab, Yervoy®), aprobado recientemente para el tratamiento del melanoma. Se han aprobado otros reguladores de coestimulación, tales como los anticuerpos anti-PD-1 de Merck (Keytruda®) y BMS (Opdivo®), que han sido aprobados para tratamientos contra el cáncer y también están en evaluación para infecciones víricas.

Por consiguiente, un objetivo de la invención es proporcionar anticuerpos inmunomoduladores de PVRIG.

Sumario breve de la invención

Por consiguiente, un objetivo de la descripción es proporcionar métodos para activar células T citotóxicas (CTLs) de un paciente que comprende administrar un anticuerpo anti-PVRIG al paciente, en el que se activa un subconjunto de las CTLs del paciente.

Otro objetivo adicional de la descripción es proporcionar métodos para activar células NK de un paciente que comprende administrar un anticuerpo anti-PVRIG al paciente, en el que se activa un subconjunto de las células NK del paciente.

Otro objetivo adicional de la descripción es proporcionar métodos para activar células γδ de un paciente que comprende administrar un anticuerpo anti-PVRIG al paciente, en el que se activa un subconjunto de las células γδ del paciente.

Otro objetivo adicional de la descripción es proporcionar métodos para activar células Th1 de un paciente que comprende administrar un anticuerpo anti-PVRIG al paciente, en el que se activa un subconjunto de las células Th1 del paciente.

Otro objetivo adicional de la descripción es proporcionar métodos para inhibir la interacción de PVRIG y PVLR2 en un paciente que padece una afección asociada a dicha interacción, que comprende administrar un anticuerpo anti-PVRIG al paciente.

Otro objetivo adicional de la descripción es proporcionar métodos para tratar cáncer en un paciente, que comprende administrar un anticuerpo anti-PVRIG al paciente, en el que se trata dicho cáncer.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar métodos como los descritos anteriormente, donde el anticuerpo anti-PVRIG comprende las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en CHA.7.518, y CHA.7.538.1.

Otro objetivo adicional de la descripción es proporcionar métodos como los descritos anteriormente, donde dicho anticuerpo anti-PVRIG compite por la unión con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PVRIG que comprende las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en CHA.7.502, CHA.7.503, CHA.7.506, CHA.7.508, CHA.7.510, CHA.7.512, CHA.7.514, CHA.7.516, CHA.7.518, CHA.7.520.1, CHA.7.520.2, CHA.7.522, CHA.7.524, CHA.7.526, CHA.7.527, CHA.7.528, CHA.7.530, CHA.7.534, CHA.7.535, CHA.7.537, CHA.7.538.1, CHA.7.538.2, CHA.7.543, CHA.7.544, CHA.7.545, CHA.7.546, CHA.7.547, CHA.7.548, CHA.7.549, CHA.7.550, CPA.7.001, CPA.7.003, CPA.7.004, CPA.7.006, CPA.7.008, CPA.7.009, CPA.7.010, CPA.7.011, CPA.7.012, CPA.7.013, CPA.7.014, CPA.7.015, CPA.7.017, CPA.7.018, CPA.7.019, CPA.7.021, CPA.7.022, CPA.7.023, CPA.7.024, CPA.7.033, CPA.7.034, CPA.7.036, CPA.7.040, CPA.7.046, CPA.7.047, CPA.7.049 y CPA.7.050.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar composiciones de dominios de unión a antígeno anti-PVRIG (que incluyen anticuerpos) que son anticuerpos anti-PVRIG, seleccionados del grupo que consiste en h518-1 y h538.1-2 (como se describe en la Figura 90).

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar dominios de unión a antígeno, que incluyen anticuerpos, que son anticuerpos anti-PVRIG, que comprenden las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en CPA.7.518 y CPA.7.538.1.

Otro objetivo de la invención es proporcionar composiciones de ácido nucleico que comprenden: a) en primer ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada que comprende vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de un anticuerpo, y b) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera que comprende vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de un anticuerpo. El anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en CHA.7.518, y CHA.7.538.1.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar composiciones de vector de expresión que comprenden el primer y segundo ácidos nucleicos como se ha indicado anteriormente.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar células hospedantes que comprenden las composiciones de vector de expresión, bien como un único vector de expresión o dos vectores de expresión.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar métodos para obtener un anticuerpo anti-PVRIG que comprende a) cultivar una célula hospedante de la invención con vector(es) de expresión en condiciones en las que se produce el anticuerpo; y b) recuperar el anticuerpo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: representación esquemática de los mecanismos de acción de la invención.

Figura 2: presenta la expresión de ARNm de PVRIG en diversos tejidos humanos normales.

Figura 3: presenta la expresión de ARNm de PVRIG en diversas poblaciones inmunes derivadas de sangre periférica y de médula ósea (en base a GSE49910).

Figura 4: presenta la expresión de ARNm de PVRIG en diversas poblaciones de linfocitos CD3+ (en base a GSE47855).

Figura 5A, 5B y 5C: presentan la expresión de ARNm de PVRIG en poblaciones celulares específicas. La Figura 5A presenta la expresión de ARNm de PVRIG en poblaciones celulares específicas obtenida mediante microscopía de captura de láser (en base a GSE39397). La Figura 5B presenta la expresión de ARNm de PVRIG en células T CD4 de pacientes normales y de cáncer, así como la expresión de células T CD4 de nodos linfáticos de drenaje y TILs de pacientes de cáncer de mama (en base a GSE36765). La Figura 5C presenta la expresión de ARNm en PVRIG de células T CD8 y CD4 derivadas de tumor de linfoma folicular y de amígdala (en base a GSE27928).

Figura 6: presenta la expresión de PVRIG en tejidos normales basados en GTEx. Los niveles de expresión se muestran en valores de log2(RPKM) (fragmentos identificados por millón de lecturas por kilobase). Los valores por encima de 1 se consideran una expresión elevada. Los tejidos se clasificación de arriba abajo en función de la expresión media. Cada punto del gráfico representa una muestra individual.

Figura 7: presenta la expresión de PVRIG en tejidos cancerosos en base a TCGA. Los niveles de expresión se muestran en valores de log2(RPKM) (fragmentos identificados por millón de lecturas por kilobase). Los valores por encima de 1 se consideran una expresión elevada. Los tejidos se clasificación de arriba abajo en función de la expresión media. Cada punto del gráfico representa una muestra individual.

Figura 8: muestra una representación de mapa de calor de los resultados de análisis de enriquecimiento en tres categorías: interacciones de proteínas, rutas y asociaciones de enfermedad. Los resultados se clasifican de arriba abajo en función del valor-p medio por fila. Solo se muestran los 10 resultados más altos de cada categoría. Los cuadrados grises indican valores-p < 0,05. Cada columna del mapa de calor corresponde a un tejido normal o canceroso, a partir del cual se deriva una lista de genes altamente correlacionados (r>0,55 usando al menos 50 muestras). Tal como se muestra en el mapa de calor, PVRIG se correlaciona con una firma de expresión génica de células T que está asociada fuertemente con la respuesta inmune y las enfermedades inmunes.

Figura 9: presenta la expresión de PVRIG en piel normal frente a melanoma (análisis GTEx y TCGA). Dicha sobre-expresión se observó en tumores sólidos adicionales y es el resultado de linfocitos y células NK infiltrados en el microentorno del tumor. En condiciones normales, no hay células inmunes infiltradas y por lo tanto los niveles de expresión de PVRIG son muy bajos.

Figura 10: presenta las correlaciones de PVRIG y PD1 en melanoma de muestras de TCGA, con varios marcadores de células T en adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon y melanoma. El marcador CD3 es un marcador general para células T y también está expresado en células NKT. Los marcadores CD4 y CD8 se usan para caracterizar la subpoblación de células T.

Figura 11: muestra la expresión de PVRIG en PBLs humanos. Se evaluaron PBLs humanos derivados de dos donantes para determinar la expresión de PVRIG. Tanto el donante 61 como el donante 40 mostraron una tinción significativa con Ab anti-PVRIG específico.

Figura 12: muestra que PVRIG-Ig exhibe una fuerte unión con las cuatro líneas celulares de melanoma humano MEL-23, Mel-624, Mel-624.38 y mel-888 evaluadas. La unión no se ve afectada por el co-cultivo con células T específicas de melanoma modificadas. La línea gris corresponde al control de isotipo, la línea continua negra corresponde a PVRIG-ECD-Ig.

Figura 13: correlación de PVRIG con células T y subpoblaciones de células T. CD3G es un componente del complejo de receptor de célula T, CD4 es un marcador para células T colaboradoras y CD8A es un componente de la proteína CD8 usado para identificar células T citotóxicas. PVRIG se correlaciona de forma elevada con células T en muchos tipos de tumores, que incluyen adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon y melanoma, que se muestran en la presente figura.

Figura 14: presenta imágenes representativas del cribado de Confirmación/Especificidad. Todas las coincidencias del cribado Primario, y el vector que expresa EGFR (control negativo), fueron re-ordenados/expresados por duplicado y

sondeados con PVRIG a 20 µg/mL. Una coincidencia específica con una elevada intensidad se muestra en verde (PVRL2). Las coincidencias no específicas se muestran en negro. Otra coincidencia débil (MAG) posteriormente se demostró que también se une a otros ligandos, lo que sugiere que no es específica.

Figura 15A-15E: presenta el efecto de diversas proteínas PVRIG-ECD-Ig M:M en la activación de células T CD4 T de ratón. Se recubrieron placas con mAb anti-CD3 (2 µg/mL) en presencia de 10 µg/mL de PVRIG-ECD Ig (lote nº198) o mIgG2a de control, según se describe en la sección de materiales y métodos. Los pocillos fueron llevados a placa con $1x10^5$ células T CD4+CD25- de ratón por pocillo en presencia de 2 µg/mL de anti-CD28 soluble. (A) La expresión de CD69 se analizó mediante citometría de flujo a 48h post-estimulación, se muestran histogramas representativos. Cada barra es la media de cultivos duplicados, las barras de error indican la desviación estándar. (B-C) Se recogieron los sobrenadantes de cultivo a 48 h post-estimulación y se analizaron los niveles de IL-2 e IFNγ de ratón mediante ELISA. Los resultados se muestran como Media ± error estándar de muestras duplicadas. (D) Efecto de respuesta a dosis de PVRIG-ECD Ig inmovilizada (se presenta la Figura 92BB sobre CD69 superficial (D) y secreción de IFNγ (E). Cada barra es la media de cultivos triplicados, las barras de error indican los errores estándar.

Figura 16: presenta el análisis FACS de PBLs transducidos con PVRIG usando un anticuerpo específico. Se proporciona el porcentaje de células con tinción positiva (respecto a vector vacío transducido) correspondiente a la proteína.

Figura 17: presenta el análisis FACS de PVRIG (tanto co-expresado con TCR F4 o en un vector bi-cistrónico con PBLs transducidos con TCR F4 y NGFR usando un anticuerpo específico). Se proporciona el porcentaje de células con tinción positiva (respecto a vector vacío transducido) correspondiente a la proteína.

Figura 18A-18B: presenta el análisis FACS llevado a cabo sobre PBLs estimulados transducidos con TCR para el experimento 1 (Figura 18A) y el experimento 2 (Figura 18B) usando un anticuerpo monoclonal específico que reconoce el domino extra-celular de la cadena beta del TCR específico transducido. Se proporciona el porcentaje de células con tinción positiva.

Figura 19: muestra que la expresión de PVRIG sobre PBLs que expresan F4 produce una reducción de la secreción de IFNγ al co-cultivar con SK-MEL23, MEL-624 y MEL-624.38 en comparación con la expresión de un vector vacío.

Figura 20A-20B: muestra que la expresión de PVRIG y F4 en PBLs mediante co-transducción (Figura 20A) no afecta a la secreción de IFNγ en co-cultivo con líneas celulares de melanoma. La expresión de PVRIG y F4 en PBLs con un vector bi-cistrónico (Figura 20B) produce una reducción de la secreción de IFNγ al co-cultivar con SK-MEL23, MEL-624 y MEL-624.38 en comparación con la expresión de un vector vacío.

Figura 21: muestra que la expresión de PVRIG y F4 en PBLs con un vector bi-cistrónico produce una reducción de la citotoxicidad mediada por células T al co-cultivar con líneas celulares de melanoma.

Figura 22: muestra la expresión de PVRIG en 3 subgrupos de niveles bajos, sin cambio y elevados de células T agotadas. Las células T agotadas fueron seleccionadas en base al nivel de expresión elevado de 4 marcadores: CD8A, PD-1, TIM-3 y TIGIT. Las muestras de baja expresión no se muestran, ya que ninguna presentó niveles detectables de PVRIG.

Figura 23A-23B: análisis de transferencia Western de proteína PVRIG humana expresada ectópicamente. Se analizaron extractos de célula completa de agrupamientos de células HEK293, transfectadas previamente con construcción de expresión que codifica PVRIG-flag humana (calle 2) o con vector vacío (calle 1) mediante WB con un anticuerpo anti-flag (23A) o con anticuerpos anti-PVRIG (23B).

Figura 24: expresión de superficie celular de proteína PVRIG-flag humana expresada ectópicamente por células HEK293 mediante análisis FACS. Se usó pAb anti-PVRIG (Abnova) para analizar células HEK293 que expresan de forma estable la proteína PVRIG-flag humana. Como control negativo se usaron células que expresan el vector vacío. La detección se llevó a cabo mediante Ab secundario conjugado a PE anti-ratón de cabra y se analizó mediante FACS.

Figura 25: muestra la secuencia de longitud completa de PVRIG humana (que muestra dos puntos de inicio de metionina diferentes) y la proteína de fusión PVRIG Fc usada en los Ejemplos. El péptido señal está subrayado, el ECD está doblemente subrayado, y el dominio Fc está subrayado con puntos.

Figura 26: muestra la secuencia de la proteína 2 relacionada con receptor de Poliovirus humano (PVLR2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador B de entrada de virus del herpes, (HVEB)), el compañero de unión de PVRIG tal como se muestra en el Ejemplo 5. PVLR2 es una glicoproteína de membrana de plasma humano.

Figura 27: especificidad de anticuerpo de PVRIG hacia células HEK modificadas para sobreexpresar PVRIG. Los datos muestran medidas MFI geométrica (gMFI) absolutas en función del aumento de concentración de anticuerpos. La línea negra discontinua con cuadrados muestra la tinción de células HEK hPVRIG con un anticuerpo anti-PVRIG humana representativo (CPA.7.021), y la línea negra continua con círculos muestra la tinción de células progenitoras HEK con el mismo anticuerpo.

Figura 28: se evaluó el ARN de PVRIG en varias líneas celulares de cáncer mediante qPCR. Los datos mostrados son la expresión relativa de ARN de PVRIG en líneas celulares como tasa de cambio respecto a los niveles células expi determinados mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Figura 29: se evaluó el ARN de PVRIG en subconjuntos clasificados de PBMC mediante qPCR. Los datos son la expresión relativa de ARN de PVRIG en cada subconjunto como tasa de cambio respecto a los niveles en células HEK GFP determinados mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. D47-D49 denotan tres donantes individuales. CD4 denota células T CD4, CD8 denota células T CD8, CD14 denota monocitos y CD56 denota células NK.

Figura 30A-30B. Figura 30A: se evaluó el ARN de PVRIG en células T CD4 clasificadas (CD4) y en células NK (NK) en condiciones vírgenes y activadas mediante qPCR. Las células T CD4 fueron estimuladas con *dynabeads* estimuladoras de células T humanas y 50 U/mL de IL-2 durante 3 días. Las células NK fueron estimuladas en 50 U/mL de IL-2 durante 3 días. Los datos mostrados son la expresión relativa de ARN de PVRIG en cada subconjunto como tasa de cambio respecto a los niveles de células expi determinados mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Se incluye Jurkat como control positivo. D47-D49 denotan tres donantes individuales. Figura 30B: se evaluó el ARN de PVRIG en células T CD8 clasificadas en condiciones vírgenes y activadas mediante qPCR. Las células T CD8 fueron estimuladas con *dynabeads* estimuladoras de células T humanas y 100 U/mL de IL-2 durante 3 días. Los datos mostrados son la expresión relativa de ARN de PVRIG en cada subconjunto como tasa de cambio respecto a los niveles de células expi determinados mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Se incluye Jurkat como control positivo. D49, 70 y 71 indican tres donantes individuales.

Figura 31A-31B: características de unión de PVRIG a líneas celulares modificadas con HEK hPVRIG, células progenitoras HEK, células CA46 y células Jurkat. HEK OE denota células HEK hPVRIG, HEK par denota células HEK progenitoras. Para los datos de Jurkat y CA46, gMFIr indica la tasa de diferencia en MFI geométrica de tinción de anticuerpo de PVRIG respecto a sus controles. La concentración indica aquella a la que se calculó la gMFIr. Ajuste no fiable indica que las características de unión de anticuerpo no cumplen los requisitos de ajuste matemático apropiados. Algunos anticuerpos no fueron evaluados en algunas condiciones debido a las malas características de unión, especificidad o fabricabilidad.

Figura 32A-32B: características de unión de PVRIG a PBMC humanas primarias, células cyno de sobre-expresión transitoria, y PBMC cyno primarias. Expi cyno OE denota células expi transfectadas transitoriamente con cPVRIG, expi par denota células expi progenitoras. gMFIr indica la tasa de diferencia en MFI geométrica de la tinción de anticuerpo de PVRIG respecto a sus controles. La concentración indica aquella a la que se calculó la gMFIr. Algunos anticuerpos no fueron evaluados en algunas condiciones debido a unas malas características de unión, especificidad o fabricabilidad, como en la Figura 31. Adicionalmente, los anticuerpos seleccionados fueron sometidos a triaje para cribado en subconjuntos de PBMC de cyno en base a su capacidad para unirse a células transitorias de cPVRIG o su funcionalidad. La expresión de PVRIG en células T CD4 es similar a la descrita en la tabla para células T CD8.

Figura 33: especificidad de anticuerpos PVRIG hacia CA46 y células Jurkat. Los datos muestran medidas de MFI geométrica (gMFI) absolutas mediante FACS en función de la concentración creciente de anticuerpos. La línea negra continua con triángulos muestra tinción de células CA46 con anticuerpo anti-PVRIG humana (CPA.7.021) y la línea negra continua con cuadrados muestra la tinción de células Jurkat. Como controles negativos, se muestran OV-90 (línea discontinua con triángulos invertidos) y NCI-H4411 (línea discontinua con diamantes).

Figura 34A-34D: Reactividad cruzada de anticuerpos de PVRIG con células transitorias de cPVRIG. Los datos muestran un ejemplo de un anticuerpo que es un aglomerante negativo (a-b, CPA.7.021) y un aglomerante positivo (c-d, CPA.7.024) en células transitorias de cPVRIG. Los histogramas grises sólidos indican anticuerpo de control, los histogramas negros huecos indican el anticuerpo de interés. Las células fueron teñidas con cada anticuerpo a una concentración de 5 µg/mL.

Figura 35: se evaluó el ARN de cPVRIG en subconjuntos clasificados de PBMC de cyno mediante qPCR. Los datos mostrados son los valores Ct medidos de tres donantes cyno, detectados mediante dos conjuntos de cebadores dirigidos a dos áreas distintas del gen cPVRIG.

Figura 36A-36C: la proteína cPVRIG fue evaluada en a) linfocitos CD16+ (células NK), b) células mieloides CD14+CD56+ (monocitos), y c) linfocitos CD3+ (células T) mediante FACS. Los datos se muestran como MFI geométrica absoluta, indicando la línea negra continua los niveles de fluorescencia de fondo. Los datos son representativos de una muestra de nuestro panel de anticuerpos anti-PVRIG humana evaluados en tres donantes cyno.

Figura 37A-37B: muestra las secuencias CDR correspondientes a Fabs que se determinó que bloquean con éxito la interacción de PVRIG con su contrapartida PVRL2, tal como se describe en el Ejemplo 5.

Figura 38A-38AA: muestra las secuencias de aminoácido de los dominios variables pesados y ligeros, las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, y las CDRs pesadas variables y ligeras variables correspondientes a las secuencias anti-PVRIG de CPA humanas enumeradas de la invención, que se unen a PVRIG y bloquean la unión de PVRIG y PVLR2.

Figura 39A-39H: muestra las secuencias de aminoácido de los dominios variables pesados y ligeros, las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, y las CDRs pesadas variables y ligeras variables correspondientes a ocho secuencias anti-PVRIG de CPA humanas enumeradas de la invención, que se unen a PVRIG y bloquean la unión de PVRIG y PVLR2.

Figura 40A-40D: muestra las CDRs correspondientes a todas las secuencias de anticuerpo anti-PVRIG CPA generadas que se unen a PVRIG, incluyendo aquellas que no bloquean la unión de PVRIG y PVLR2.

Figura 41A a 41DD: muestra las cadenas variables pesadas y ligeras, así como las secuencias de vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de cada uno de los anticuerpos CHA de la invención, CHA.7.502, CHA.7.503, CHA.7.506, CHA.7.508, CHA.7.510, CHA.7.512, CHA.7.514, CHA.7.516, CHA.7.518, CHA.7.520.1, CHA.7.520.2, CHA.7.522, CHA.7.524, CHA.7.526, CHA.7.527, CHA.7.528, CHA.7.530, CHA.7.534, CHA.7.535, CHA.7.537, CHA.7.538.1, CHA.7.538.2, CHA.7.543, CHA.7.544, CHA.7.545, CHA.7.546, CHA.7.547, CHA.7.548, CHA.7.549 y CHA.7.550 (éstas incluyen las secuencias variables pesadas y ligeras correspondientes a secuencias de ratón (de Hibridomas)).

Figura 42: muestra los resultados de agrupamientos del Ejemplo 11. No agrupado: CPA.7.029 y CPA.7.026 (no unión al antígeno).

Figura 43: matriz binaria de bloque por pares (“0”, cuadro rojo) o de sándwich (“1”, cuadro verde) de antígeno para 35 mAbs anti-PVRIG. Los mAbs enumerados verticalmente a la izquierda de la matriz son mAbs inmovilizados covalentemente sobre la matriz ProteOn. Los mAbs enumerados horizontalmente en la parte superior de la matriz fueron analitos inyectados con antígeno pre-mezclado. El clon CPA.7.041 se estudió solo como como analito. Los cuadros negros recogen cuatro contenedores de epítopo según los patrones de bloqueo de los mAbs.

Figura 44: dendograma de agrupamiento jerárquico de los patrones de unión vertical de cada mAb de la matriz binaria de la Figura 43. Existen cuatro contenedores de mAbs con patrones de bloqueo de epítopo idénticos en cada grupo. La única diferencia entre los contenedores 1 y 2 es que los mAbs del contenedor 1 bloquean la unión a antígeno al clon CPA.7.039, mientras que los mAbs del contenedor 2 pueden formar un sándwich entre el antígeno y el CPA.7.039. El clon CPA.7.050 puede formar un sándwich entre el antígeno y los demás clones.

Figura 45A-45JJ: sensogramas que indican el patrón de bloqueo de antígeno correspondiente a CPA.7.036 con todos los demás mAbs inmovilizados, que constituyen datos representativos para el Contenedor nº 1. Cada panel representa un punto de la matriz de chip ProteOn que tiene un mAb inmovilizado diferente. Las respuestas azules son controles solo de antígeno. Las respuestas negras son disoluciones pre-mezcladas de CPA.7.036 en exceso molar de antígeno. Las respuestas grises son inyecciones de control solo de mAb. CPA.7.36 bloquea la unión de antígeno a los demás mAbs excepto para CPA.7.050 (JJ).

Figura 46A-46JJ: sensogramas que indican el patrón de bloqueo de antígeno correspondiente a CPA.7.034 con todos los demás mAbs inmovilizados, que constituyen datos representativos para el Contenedor nº 2. Cada panel representa un punto de la matriz de chip ProteOn que tiene un mAb inmovilizado diferente. Las respuestas azules son controles solo de antígeno. Las respuestas negras son disoluciones pre-mezcladas de CPA.7.34 en exceso molar de antígeno. Las respuestas grises son inyecciones de control solo de mAb. CPA.7.34 bloquea la unión de antígeno a los demás mAbs excepto para CPA.7.039 (DD) y CPA.7.050 (JJ).

Figura 47A-47JJ: sensogramas que indican el patrón de bloqueo de antígeno correspondiente a CPA.7.039 con todos los demás mAbs inmovilizados. CPA.7.039 es el único mAb del Contenedor nº 3. Cada panel representa un punto de la matriz de chip ProteOn que tiene un mAb inmovilizado diferente. Las respuestas azules son controles solo de antígeno. Las respuestas negras son disoluciones pre-mezcladas de CPA.7.039 en exceso molar de antígeno. Las respuestas grises son inyecciones de control solo de mAb. Los paneles C, F, H, J, L, N, R, S, Z, EE, GG, HH, II y JJ muestran formación de sándwich con el antígeno.

Figura 48A-48JJ: sensogramas que indican el patrón de bloqueo de antígeno correspondiente a CPA.7.050 con todos los demás mAbs inmovilizados. CPA.7.050 es el único mAb del Contenedor nº 4. Cada panel representa un punto de la matriz de chip ProteOn que tiene un mAb inmovilizado diferente. Las respuestas azules son controles solo de antígeno. Las respuestas negras son disoluciones pre-mezcladas de CPA.7.50 en exceso molar de antígeno. Las respuestas grises son inyecciones de control solo de mAb. Solo el panel JJ muestra bloque de antígeno, que es donde el CPA.7.050 fue inyectado con antígeno sobre sí mismo.

Figura 49: muestra los resultados de los experimentos SPR del Ejemplo 12.

Figura 50A-50Q SPR: datos de sensograma de concentraciones múltiples fabs anti-PVRIG en sobrenadante inyectado en proteína de fusión PVRIG humana capturada (líneas negras). Las líneas rojas muestran el ajuste cinético global 1:1 de múltiples concentraciones de los fabs para estimar la k_a y la k_d de las interacciones. Las letras indican el clon enumerado en la Tabla 1, que también incluye las constantes cinéticas resultantes y la K_D calculada.

Figura 51A-51C: sensogramas SPR correspondientes a la unión de los clones CPA.7.009 (A), CPA.7.003 (B), y CPA.7.014 (C) a proteína de fusión PVRIG humana capturada. Se trata de ejemplos en los que los sensogramas mostraron cinéticas multi-fásicas complejas y, por tanto, las constantes cinéticas no pudieron estimarse con fiabilidad.

Figura 52A-52B: muestra los resultados de los estudios de bloqueo del "Estudio de validación adicional 4" del Ejemplo 5.

Figura 53: muestra que después de la alo-activación, la expresión de PVRIG fue regulada al alza en células T CD4+, así como en células T CD8+, y células T gamma delta doble negativas. Esta regulación al alza se observó en PBMCs de uno de cada dos donantes evaluados.

Figura 54: muestra las líneas celulares humanas evaluadas en el Ejemplo 1G.

Figura 55: muestra las líneas celulares de ratón evaluadas en el Ejemplo 1G.

Figura 56A-56C: expresión de tránscrito de PVRIG humana en diversas líneas celulares de cáncer. La verificación del tránscrito humano en varias líneas celulares se llevó a cabo mediante qRT-PCR usando la sonda TaqMan. El diagrama de columnas representa los datos observados usando la sonda TaqMan Hs04189293_g1. Los valores Ct se detallan en la tabla. Análisis que indica un tránscrito elevado en las líneas celulares Jurkat, HUT78 y HL60, y niveles menores en THP1 y RPMI8226.

Figura 57A-57B: expresión de tránscrito de PVRIG de ratón en diversas líneas celulares de cáncer. La verificación del tránscrito de ratón en varias líneas celulares se llevó a cabo mediante qRT-PCR usando la sonda TaqMan. El diagrama de columnas representa los datos observados usando la sonda TaqMan CC70L8H. Los valores Ct se detallan en la tabla. Análisis que indica un tránscrito elevado en las líneas celulares NIH/3T3, Renca, SaI/N y J774A.1, y niveles menores en CT26 y B104-1-1.

Figura 58: la expresión endógena de proteína PVRIG se analizó mediante WB con el anticuerpo comercial policlonal de conejo anti-PVRIG humana (Sigma, cat. Nº HPA047497), usando extractos celulares enteros de diversas líneas celulares. Los extractos de células HEK293 que sobre-expresan ectópicamente PVRIG humana (calle 2) o de células transfectadas con vector vacío (calle 1), se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Figura 59: análisis qRT-PCR de tránscrito de PVRIG en la línea celular Jurkat transfectada con siARN de PVRIG. La línea celular de cáncer humano Jurkat, transfectada con siARN de PVRIG humana o con siARN mixto fue analizada mediante qRT-PCR usando la sonda TaqMan de PVRIG humana nº Hs04189293_g1, y se normalizó con geo-media de dos genes domésticos indicados en la tabla anterior. Los valores Ct se detallan en la tabla. Se indica la desviación estándar de triplicados técnicos de la reacción de PCR.

Figura 60: expresión de membrana de proteína PVRIG humana en la línea celular humana Jurkat transfectada con siARN de PVRIG humana. Las células Jurkat transfectadas con siARN de PVRIG humana fueron teñidas con Ab Inc monoclonal anti-PVRIG, CPA.7.021 (panel izquierdo, línea verde) o con anticuerpo de control de isotipo IgG2 (panel izquierdo, línea azul) y con Ab Sigma (panel derecho, línea roja) o con IgG (panel derecho, línea azul). Las células transfectadas con siARN mixto fueron teñidas con el mismo anti-PVRIG (naranja) o control de isotipo (panel izquierdo, línea roja, para tinción de mAb; panel derecho, línea verde, para Sigma Ab). Tras un lavado celular, se añadió Ab secundario conjugado anti-ratón de cabra-PE solo a Sigma Ab.

Figura 61: indica un resumen de los descubrimientos descritos en este informe, destacando las líneas celulares que muestran correlación entre qPCR y FACS, confirmada mediante bloqueo, HSKG- gen doméstico, +- Positivo, NT- No evaluado, X- negativo, KD- bloqueado.

Figura 62: indica un resumen de los descubrimientos descritos en este informe, destacando las líneas celulares que muestran correlación entre qPCR y FACS, confirmada mediante bloqueo, HSKG- gen doméstico, +- Positivo, NT- No evaluado, X- negativo, KD- bloqueado.

Figura 63A-63D: muestra las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de cada uno de los anticuerpos CPA enumerados en la invención, de CPA.7.001 a CPA.7.050 son secuencias humanas (de visualización de fagos).

Figura 64A-64B: muestra los resultados del cribado del Ejemplo 1B.

Figura 65: anticuerpos específicos y concentración de tinción usada en el Ejemplo 1I.

Figura 66A-66C: muestra las secuencias de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

Figura 67: muestra un número de fragmentos ECD de PVRIG humana.

Figura 68: muestra la curva de unión correspondiente a CPA.7.021 tal como se muestra en el Ejemplo 13.

Figura 69A-69C: Detección de la expresión superficial de CD137 y PD-1. Se activaron células T CD8+, células T CD4+ y TILs y se monitorizaron a lo largo del tiempo en 4 puntos temporales tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las células en reposo o activadas fueron acotadas en primer lugar para linfocitos (FSC-A frente a SSC-A), seguido de acotamiento de células vivas, acotamiento posterior para singletes (FSC-H frente a FSC-A), células positivas CD4/CD8 y acotamiento adicional para CD137 y PD1. Expresión superficial de PD-1 (izquierda) y CD137 (derecha) en (A) células T CD8+, (B) células T CD4+ y (C) TILs a diferentes tiempos finales normalizada respecto al control de isotipo a lo largo del tiempo de transcurso de la activación.

Figura 70A-70C: expresión de PVRIG en células T CD4+ y T CD8+ en reposo y activadas. Las células T CD4+ y CD8+ fueron activadas y monitorizadas a lo largo de cuatro puntos temporales como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las células fueron teñidas con colorante de viabilidad, a continuación se incubaron con anti-PVRIG y control de isotipo (7,5 µg/mL), y se evaluaron mediante citometría de flujo. (A) Expresión de células T CD4+. Expresión de PVRIG en células CD4+ vivas en reposo (tiempo 0) y activadas tras acotamiento de singlete para 24, 48, 72h y 144h en comparación con el control de isotipo. (B) Expresión en células T CD8+. Expresión de PVRIG en células CD8+ vivas en reposo (tiempo 0) y activadas tras acotamiento de singlete para 24, 48, 72h y 144h en comparación con el control de isotipo. Mostrada como la Media Geométrica de los valores de intensidad fluorescente obtenida. (C) Normalización de tinción de inducción de plegamiento con ab anti-PVRIG-CPA.7.021 en comparación con el isotipo de IgG2 humana con el tiempo en el transcurso de la activación.

Figura 71A-71C: expresión de PVRIG en TILs en reposo y activadas. Se activaron TILs Mart1 y 209 y se monitorizaron a lo largo del tiempo en cuatro puntos temporales, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las células fueron teñidas con colorante de viabilidad, a continuación se incubaron con anti-PVRIG y control de isotipo (7,5 g/mL), y se evaluaron mediante citometría de flujo. (A) Expresión en TIL Mart1. Expresión de PVRIG en TIL vivas en reposo (tiempo 0) y activadas después de acotamiento de singlete para 24, 48, 72h y 144h en comparación con el control de isotipo. (B) Expresión en TIL 209. Expresión de PVRIG en TIL vivas en reposo (tiempo 0) y activadas después de acotamiento de singlete para 24, 48, 72h y 144h en comparación con control de isotipo. Se muestran las Medias Geométricas de los valores de intensidad fluorescente obtenidos. (C) Normalización de tinción de inducción de pliegue con ab anti PVRIG-CPA.7.021 en comparación con el control de isotipo de IgG2 con el tiempo en el transcurso de la activación.

Figura 72: Expresión de PVRL2 en DC derivadas de monocitos. Se muestra la expresión de PVRL2 (triángulos con línea discontinua) en función del tiempo (días) respecto del control de isotipo (círculos con línea continua). Día después de diferenciación indica el tiempo después de la adición de GM-CSF e IL-4 a los monocitos.

Figura 73A-73B: Expresión de PVRIG en células T CD4 y CD8 en el MLR. Se muestra la expresión de PVRIG en células T en proliferación (CFSE bajo) y no proliferación (CFSE alto). Los datos derivan de tres donantes de células T CD3 individuales y un rango de anticuerpos de PVRIG. CFSE se mide en el eje X y la expresión de PVRIG se mide en el eje Y. Las 3 series superiores de representaciones de puntos indican la expresión de PVRIG en células T CD4, y las 3 series inferiores indican la expresión en células T CD8.

Figura 74A-74B: Expresión normalizada de PVRIG en células T CD4 y CD8 en el MLR. Se muestra la expresión de PVRIG normalizada respecto al control de isotipo de mIgG1 de tres donantes de células T CD3 individuales para todos los anticuerpos analizados.

Figura 75A-75B: Los anticuerpos de PVRIG aumentan la proliferación de células T en el MLR. Se muestran los porcentajes de niveles bajos de CFSE a partir de los ensayos de MLR tratados con los anticuerpos de PVRIG indicados. Cada gráfico representa un donante de células T CD3 individual.

Figura 76: Análisis de epítopos basado en FACS de anticuerpos de PVRIG en células T. Se indica el nivel de unión de CPA.7.021 conjugado (derivado de la campaña de fagos) tras la pre-incubación de células T con anticuerpos de PVRIG no conjugados derivados de nuestra campaña de hibridoma, así como los controles relevantes. El análisis se llevó a cabo en células T de CFSE bajo derivadas del MLR.

Figura 77: Especificidad de anticuerpo de PVRIG hacia células HEK diseñadas para sobre-expresar PVRIG. Los datos muestran las medidas de MFI geométrica (gMFI) absoluta en función del incremento de concentración de anticuerpos. La línea negra discontinua con cuadrados muestra la tinción de células HEK hPVRIG con un anticuerpo de PVRIG anti-humano representativo (CHA.7.518), y la línea negra continua con círculos muestra la tinción de células HEK progenitoras con el mismo anticuerpo.

Figura 78: Los anticuerpos de PVRIG muestran especificidad hacia células Jurkat. Los datos muestran las medidas de MFI geométrica (gMFI) absoluta por FACS en función del incremento de concentración de anticuerpos. La línea negra discontinua con cuadrados muestra la tinción de células Jurkat con el anticuerpo de PVRIG anti-humano (CHA.7.518), y la línea negra continua con círculos muestra la tinción con un anticuerpo de control mIgG1.

Figura 79A-79B: Características de unión a anticuerpo de hibridoma de PVRIG a líneas celulares modificadas de HEK hPVRIG, células HEK progenitoras y células Jurkat. HEK OE denota células HEK hPVRIG, HEK par denota células HEK progenitoras. Para los datos de Jurkat, gMFIr indica la tasa de diferencia en MFI geométrica de la tinción de

anticuerpos de PVRIG respecto a sus controles. La concentración indica aquella a la cual se calculó la gMFIr. No unión indica que el anticuerpo no se une a la línea celular evaluada. Los anticuerpos resaltados son los cuatro primeros anticuerpos de interés.

Figura 80A-80B: Características de unión de anticuerpo de hibridoma de PVRIG a PBMC humanas primarias, células cyno de sobre-expresión, y PBMCs de cyno primarias. Expi cyno OE denota células expi transfectadas transitoriamente con cPVRIG, expi par denota células parenterales expi. gMFIr indica la tasa de diferencia en MFI geométrica de tinción de anticuerpo de PVIRG respecto a sus controles. Las concentraciones indican aquellas a las que se calculó la gMFIr. No evaluado indica los anticuerpos que no fueron evaluados debido a una ausencia de unión a HEK hPVRIG humana, células cPVRIG expi, o no que cumplen los requerimientos de unión a subconjuntos de PBMC. Los anticuerpos destacados son los cuatro primeros anticuerpos de interés.

Figura 81A-81B: Resumen de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos de PVRIG en el ensayo competitivo basado en FACS. Se indica la IC_{50} de la inhibición. No IC_{50} indica que dichos anticuerpos son no-bloqueantes. Los anticuerpos destacados son los cuatro primeros anticuerpos de interés.

Figura 82: Validación de KD llevada a cabo en TILs 24h después de electroporación con siARN. Las TILs fueron teñidas con anti PVRIG o anti PD-1 analizado con FACS. El porcentaje de población KD se calcula respecto a SCR teñido con el Ab relevante.

Figura 83A-83C: Se co-cultivaron KD TILs (específicas de MART-1) con células de melanoma 624 en E:T 1:1 durante 18 h y se tiñeron con anticuerpo anti CD8a, así como con anticuerpo anti CD137, y se analizaron mediante FACS. Se representa la intensidad de fluorescencia media geométrica (A). Asimismo, se recolectó el sobrenadante de co-cultivo, y se evaluó en un ensayo de matriz de perlas citométricas Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ y TNF (B,C). El porcentaje de efecto de un tratamiento se calcula comparando dicho tratamiento con el control de SCR. La figura muestra datos representativos de 2 experimentos independientes. Los tratamientos se comparan con el test-t de Student (*P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01) de muestras triplicadas.

Figura 84A-84B: Se co-cultivaron KD TILs (específicas de F4 gp100) con células de melanoma 624 en E:T 1:3 durante 18h y se tiñeron con anticuerpo anti CD8a, así como con anticuerpo anti CD137, y se analizaron mediante FACS. Se representa la intensidad de fluorescencia media geométrica (A). Asimismo, se recolecto el sobrenadante de co-cultivo y se evaluó en un ensayo de matriz de perlas citométrico Th1 Th2 Th17 para detectar las citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (B). Se ha calculado el porcentaje del efecto de tratamiento comparando cada tratamiento con el control de SCR. La Figura muestra los datos representativos de 2 experimentos independientes. Se compararon los tratamientos mediante test-t de Student (*P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01) de muestras triplicadas.

Figura 85A-85B: Se co-cultivaron TILs con células de melanoma 624 a E:T 1:1 durante 18h en presencia de Ab anti-PVRIG (CPA.7.021; 10 µg/mL), anti-TIGIT (clon 10A7; 10 µg/mL) o en combinación. Se recolectó el sobrenadante y se evaluó en un ensayo de matriz de perlas citométricas Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (A) y TNF (B). Los tratamientos se compararon con el test-t de Student (*P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01) de muestras triplicadas.

Figura 86A-86F: se co-cultivaron TILs MART-1 o 209 con células de melanoma 624 a E:T 1:1 durante 18h en presencia de Ab anti-PVRIG (CPA.7.021; 10 µg/mL), anti-DNAM1 (clon DX11; 10 µg/mL) o en combinación. Se recolectó el sobrenadante y se evaluó en un ensayo de matriz de perlas citométricas Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (A,D) y TNF (B,E). Las TILs fueron teñidas para expresión superficial de CD137 (C,F).

Figura 87A-87B: se co-cultivaron TILs (F4) con células de melanoma 624 a E:T 1:3 durante 18h en presencia de Ab anti-PVRIG (CPA.7.021; 10 µg/mL), anti-TIGIT (clon 10A7; 10 µg/mL), anti-PD1 (mAb 1B8, Merck; 10 µg/mL) o en combinación. Se recolectó el sobrenadante y se evaluó en un ensayo de matriz de perlas citométricas Th1 Th2 Th17 para detectar citoquinas secretadas. Se detectaron los niveles de IFNγ (A) y TNF (B).

Figuras 88A-88II: Muestra cuatro secuencias humanizadas correspondientes a CHA.7.518, CHA.7.524, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2. Nótese que la cadena ligera de CHA.7.538_2 es la misma que la de CHA.7.538_1. La "H1" de cada una es una "permuta de CDR" sin cambios en la estructura humana. Las secuencias posteriores alteran cambios estructurales mostrados en fuente negrita más grande. Las secuencias de CDR se muestran en negrita. Las definiciones de CDR son AbM de la web www.bioinf.org.uk/abs/. Las secuencias de línea germinal human y de unión de IMGT® el sistema de información internacional de ImMunoGeneTics® www.imgt.org (fundador y director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia). La numeración de residuos mostrada como secuencial (seq) o de acuerdo a Chothia, del sitio web www.bioinf.org.uk/abs/ (AbM). "b" denota cadena lateral enterrada; "p" denota parcialmente enterrada; "i" denota cadena lateral en la interfaz entre los dominios VH y VL. Diferencias de secuencias entre líneas germinales humana y de ratón denotadas mediante asterisco (*). Las potenciales mutaciones adicionales en las estructuras se indican debajo de la secuencia. Los potenciales cambios en las secuencias CDR se indican debajo de cada secuencia CDR, tal como se indica en la figura (nº de sustituciones de desamidación: Q/S/A; éstas pueden prevenir la desamidación de asparagina (N). @ sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H; éstas pueden prevenir la oxidación de triptófano; @ sustituciones de oxidación de metionina: L/F/A.

Figuras 89A-E: muestran una recopilación de las secuencias humanizadas de cinco anticuerpos CHA.

Figura 90: muestra esquemas para combinar los anticuerpos CHA VH y VL humanizados de las Figuras 88 y las Figuras 89. “chimVH” y “chimVL” son las secuencias variables de cadena pesada y ligera de ratón unidas a un dominio constante de IgG humana.

Figura 91: Características de unión a anticuerpo de hibridoma de PVRIG a PBMC humanas primarias, células cyno sobre-expresadas, y PBMCs cyno primarias. Expi cyno OE denota células expi transfectadas transitoriamente con cPVRIG, expi par denota células progenitoras expi. gMFIr indica la tasa de diferencia en MFI geométrica de tinción de anticuerpo de PVRIG respecto a sus controles. Las concentraciones indican aquellas a las que se calculó la gMFIr. No evaluado indica anticuerpos que no fueron evaluados debido a una ausencia de unión a HEK hPVRIG, células cPVRIG expi, o no que no cumplen los requerimientos de unión a subconjuntos de PBMCs. Los anticuerpos resaltados son cuatro anticuerpos para los cuales se realizó la humanización (véase la Figura 90).

Figura 92: Resumen de la capacidad bloqueante de anticuerpos de PVRIG en el ensayo competitivo basado en FACS. Se indica la IC_{50} de inhibición. No IC_{50} indica que dichos anticuerpos son no-bloqueantes. Los anticuerpos destacados son cuatro anticuerpos para los cuales se ha realizado la humanización (véase la Figura 90).

Figura 93A-93C. Efecto de los anticuerpos de PVRIG en el bloqueo de la interacción entre PVRIG y PVRL2. (a-b) Los datos muestran cambios en la gMFI absoluta que representan cambios en la unión de PVRIG soluble a células HEK cuando se añaden cuatro anticuerpos de PVRIG para alterar la interacción. También se indican los valores de IC50 de cada anticuerpo en cada ensayo. A) Los datos muestran la disrupción de PVRIG soluble en células HEK cuando los anticuerpos son pre-incubados con antígeno. B) Los datos muestra la disrupción de PVRIG soluble con células HEK cuando se añaden los anticuerpos concomitantemente con el antígeno. C) Los datos muestran cambios en gMFI absoluta que representan cambios en la unión de PVRL2 Fc soluble a células HEK hPVRIG cuando se añaden cuatro anticuerpos de PVRIG para alterar la interacción. Se indican los valores de IC_{50} de cada anticuerpo. ND denota no determinado.

Figura 94A-94H: Expresión de receptor y ligando de células NK en células Reh. Se muestra la expresión de receptores de célula NK tales como a) PVRIG, b) DNAM-1, c) TIGIT. Se muestra la expresión de ligandos de receptor NK tales como d) PVR, e) PVRL2, f) ULBP2/5/6, g) ULBP3 y h) MICA/B. Los histogramas gris sólidos representan los controles de isotipo y los histogramas negros huecos representan el anticuerpo de interés.

Figura 95: Efecto de anticuerpos de PVRIG en el aumento de la citotoxicidad mediada por células NK contra células Reh. Se examinó el efecto de 5 µg/mL de CPA.7.002 (a), CPA.7.005 (b), CPA.7.021 (a-c), y CPA.7.050 (c) en ensayos de citotoxicidad de células NK contra células Reh, donde el número de células NK fue valorado contra un número constante de células Reh. d) Se examinó el efecto de variar la concentración de CPA.7.002 y CPA.7.021 sobre la citotoxicidad mediada por células NK con un número constante de células NK respecto a Reh (5:1). Se examinó DNAM-1 (e) y TIGIT (f) en ensayos con condiciones como las descritas en los paneles a-c.

Figura 96A-96H: Expresión de receptor y ligando de células NK en células MOLM-13. Se muestra la expresión de receptores de células NK tales como a) PVRIG, b) DNAM-1, e) TIGIT. Se muestra la expresión de ligandos de receptor NK tales como d) PVR, e) PVRL2, f) ULBP2/5/6, g) ULBP3, y h) MICA/B. Los histogramas grises sólidos representan los controles de isotipo y los histogramas negros abiertos representan el anticuerpo de interés.

Figura 97A-97B: Efecto de anticuerpos de PVRIG sobre el aumento de la citotoxicidad mediada por células NK contra células MOLM-13. a) Se examinó el efecto de 5 µg/mL de CPA.7.002, CPA.7.005, y CPA.7.021 en ensayos de citotoxicidad de células NK contra células MOLM-13, donde el número de células NK fue valorado contra un número constante de células MOLM-13. b) Se examinó TIGIT de forma similar al panel a.

Figura 98: Resumen de la capacidad de bloqueo de anticuerpos de PVRIG en el ensayo bioquímico celular. Se indica la permutación de ensayo y orientación, y la IC_{50} de inhibición. (P) indica la permutación de ensayo donde los anticuerpos de PVRIG son pre-incubados con antígeno de PVRIG antes de la adición a células HEK. (NP) indica la adición concomitante de anticuerpos de PVRIG y de antígeno de PVRIG a células HEK. El aumento de unión indica que la unión de PVRL2 Fc a células HEK hPVRIG se vio potenciada, en lugar de inhibida.

Figura 99: Resumen de la actividad de anticuerpos de PVRIG seleccionados en ensayos de citotoxicidad de células NK contra células Reh y MOLM-13. La tasa de cambio de la citotoxicidad respecto al control se calculó dividiendo el nivel absoluto de muerte (%) en la condición con anticuerpo de PVRIG, por el nivel absoluto de muerte (%) con anticuerpo de control. La tasa de cambio se calcula a partir de la ratio efector a diana de 5:1.

Figura 100: Alineamiento de secuencia de ortólogos de PVRIG. Secuencias alineadas del dominio extra-celular de PVRIG de humano, cynomolgus, marmoset y Rhesus. Las diferencias entre humanos y cynomolgus están resaltadas en amarillo.

Figura 101: Unión de anticuerpos anti-PVRIG humana a variantes de PVRIG de cyno, humanas e híbridas cyno/humana. Se muestra la unión de anticuerpos a PVRG natural de cyno (●), H61R cyno PVRIG (■), P67S cyno

PVRIG (▲), L95R/T97I cyno PVRIG (▼) y human PVRIG humana natural (♦). Se representan las señales ELISA en función de la concentración de anticuerpos.

Figura 102: Correlación de grupo de epítopos y reactividad cruzada con cyno de anticuerpos anti-PVRIG humana.

Figura 103A-103BX: muestra una serie de secuencias de uso en la invención.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

El cáncer puede considerarse como una incapacidad del paciente para reconocer y eliminar células cancerosas. En muchos casos, dichas células transformadas (p.ej., cancerosas) contrarrestan la inmunovigilancia. Existen mecanismos de control naturales que limitan la activación de células T en el cuerpo para prevenir la actividad incontrolada de células T, que pueden ser aprovechados por las células cancerosas para evadir o suprimir la respuesta inmune. La restauración de la capacidad de las células inmunes efectoras, especialmente las células T, para reconocer y eliminar el cáncer es la meta de la inmunoterapia. El campo de la inmuno-oncología, a veces referida como "inmunoterapia", está evolucionando rápidamente, con varias aprobaciones recientes de anticuerpos inhibidores de punto de control de células T, tales como Yervoy, Keytruda y Opdivo. Dichos anticuerpos generalmente se denominan "inhibidores de punto de control" debido a que bloquean los reguladores normalmente negativos de la inmunidad de células T. De forma general, se entiende que se puede usar una variedad de señales inmunomoduladoras, tanto coestimuladoras como coinhibidoras, para orquestar una respuesta inmune específica de antígeno óptima. Generalmente, dichos anticuerpos se unen a proteínas inhibidoras de puntos de control tales como CTLA-4 y PD-1, lo que en circunstancias normales previene o suprime la activación de células T citotóxicas (CTLs). Con la inhibición de la proteína de punto de control, por ejemplo a través del uso de anticuerpos que se unen a dichas proteínas, se puede conseguir un aumento de la respuesta de células T contra tumores. Es decir, dichas proteínas de punto de control cancerosas suprimen la respuesta inmune; cuando las proteínas son bloqueadas, por ejemplo usando anticuerpos para la proteína de punto de control, el sistema inmunitario se activa, dando lugar a una estimulación inmune, que da como resultado el tratamiento de afecciones tales como el cáncer y enfermedades infecciosas.

La presente invención está dirigida al uso de anticuerpos para la Proteína que Contiene Dominio de Inmunoglobulina Relacionada con Receptor del Poliovirus, o "PVRIG", a veces también denominada aquí "proteína PV". La PVRIG se expresa sobre la superficie celular de células NK y T y comparte varias similitudes con otros puntos de control inmunes conocidos.

Se usaron algoritmos computacionales para analizar el genoma humano a fin de identificar nuevos puntos de control inmunes. Se identificaron genes que se predice que son proteínas superficiales celulares, que tienen un dominio de Ig y que se expresan en células inmunes dentro del microentorno tumoral, específicamente en linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), que se presume que son receptores. Se identificaron las proteínas que tienen un único dominio IgV y que tiene una estructura de tipo ITIM intracelular, lo que sugiere que están actuando como punto de control inmune y que presentan un efecto inhibidor sobre las células T y/o las células NK. Una vez identificados computacionalmente, se realizaron varios experimentos de validación, que incluyen: estudios de expresión que demuestran que la PVRIG se expresa sobre linfocitos y sobre linfocitos dentro del microentorno tumoral y que tiene un efecto inhibidor sobre las células NK y T (demostrados ambos con experimentos de bloqueo y con anticuerpos dirigidos a PVRIG). Se identificó/confirmó que PVRL2 es la contrapartida de PVRIG. Se generaron anticuerpos que se unen a PVRIG, y a continuación se identificó un subconjunto de los mismos que se unía a PVRIG y que bloqueaba la interacción de PVRIG y PVLR2.

Por consiguiente, cuando la PVRIG se une a su ligando (PVRL2), se activa una señal inhibidora que actúa para atenuar la respuesta inmune de células NK y T contra una célula diana (es decir, análogo a PD-1/PDL1). El bloqueo de la unión de PVRL2 a PVRIG desconecta dicha señal inhibidora de la PVRIG y como resultado modula la respuesta inmune de las células NK y T. El uso de un anticuerpo contra PVRIG que bloquea la unión a PVRL2 es una estrategia que podría potenciar la muerte de células cancerosas por células NK y T. Se han generado anticuerpos de bloqueo que se unen a PVRIG y que bloquean la unión de su ligando, PVRL2.

Tal como se muestra en la sección de Ejemplos más adelante, la expresión de PVRIG ha sido correlacionada positivamente con la expresión de PD-1, una proteína de punto de control inmune conocida. Adicionalmente, se demostró que la introducción de PVRIG (como proteína de fusión de dominio extracelular (ECD)) inhibe la activación de células T, y por tanto el uso de anticuerpos anti-PVRIG conduce a la activación de células T. Por consiguiente, se pueden usar anticuerpos anti-PVRIG para tratar afecciones para las cuales se desea la activación de células T o NK, tal como en el cáncer.

Los efectos funcionales de los anticuerpos de bloqueo de PVRIG sobre las células NK y T puede determinarse *in vitro* (y en algunos casos *in vivo*, tal como se describe más detalladamente en secciones posteriores) midiendo los cambios en los siguientes parámetros: proliferación, liberación de citoquinas y marcadores de superficie celular. Para las células NK, los incrementos de la proliferación celular, la citotoxicidad (capacidad para matar células diana, medida por un aumento de CD107a, granzima, y expresión de perforina, o midiendo indirectamente la muerte de células diana), la

producción de citoquinas (p.ej., IFN-γ y TNF), y la expresión de receptor de superficie celular (p.ej., CD25) son indicativos de modulación inmune, p.ej., de un aumento de la muerte de células cancerosas. Para las células T, los aumentos de la proliferación, los aumentos de la expresión de marcadores de superficie celular de activación (p.ej., CD25, CD69, CD137 y PD1), la citotoxicidad (capacidad para matar células diana), y la producción de citoquinas (p.ej., IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNF-a, IL-10, IL-17A) son indicativos de modulación inmune, p.ej., de un aumento de la muerte de células cancerosas.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos, que incluyen dominios de unión a antígeno, que se unen a pps PVRIG humana y a métodos para activar las células T para tratar el cáncer.

II. Proteínas PVRIG

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a proteínas PVRIG. "Proteína" en este contexto se usa de forma intercambiable con "polipéptido", e incluye también péptidos. La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a proteínas PVRIG. La PVRIG es una proteína de dominio de transmembrana de 326 aminoácidos de longitud, con un péptido señal (que se extiende desde al aminoácido 1 al 40), un dominio extracelular (que se extiende desde el aminoácido 41 al 171), un dominio transmembrana (que se extiende desde el aminoácido 172 al 190) y un dominio citoplásmico (que se extiende del aminoácido 191 al 326). La proteína PVRIG de longitud completa se muestra en la Figura 25. Existen dos metioninas que pueden ser codones de inicio, pero las proteínas maduras son idénticas.

Por consiguiente, tal como se usan en la presente memoria, los términos "PVRIG" o "proteína PVRIG" o "polipéptido PVRIG" pueden incluir opcionalmente cualquiera de dichas proteínas, o variantes, conjugados o fragmentos de los mismos, que incluyen aunque sin limitación la PVRIG conocida o natural, tal como se describe en la presente memoria, así como cualesquier variantes de división naturales, variantes de aminoácido naturales o isoformas, y en particular el fragmento ECD de PVRIG. El término forma "soluble" de la PVRIG también se usa de forma intercambiable con los términos "ectodominio soluble (ECD)" o "ectodominio" o "dominio extracelular (ECD), así como "fragmentos de polipéptidos de PVRIG", que pueden referirse de forma amplia a uno o más de los siguientes polipéptidos opcionales:

Las proteínas PVRIG contienen un dominio de inmunoglobulina (Ig) dentro del dominio extracelular, que es un dominio de pliegue Ig de tipo PVR. El dominio de pliegue Ig de tipo PVR puede ser responsable de la unión de contrapartida funcional, por analogía con los otros miembros de la familia B7. El dominio de pliegue Ig de tipo PVR del dominio extracelular incluye un enlace de disulfuro formado entre los residuos de cisteína intra dominio, como es típico para este pliegue y puede ser importante para la estructura-función. Estas cisteínas están localizadas en los residuos 22 y 93 (o 94). En una realización, se proporciona un fragmento soluble de PVRIG que puede usarse en la evaluación de anticuerpos de PVRIG.

Dentro de la definición de proteínas PVRIG se incluyen los fragmentos ECD de PVRIG. Opcionalmente, los fragmentos ECD de PVRIG también se refieren a una cualquiera de las secuencias de polipéptido enumeradas en la Figura 67, que de forma razonable es de esperar que comprendan regiones funcionales de la proteína PVRIG. Esta expectativa se basa en un análisis sistemático de un conjunto de complejos proteínicos con estructuras 3D resueltas, que contenían complejos de proteínas Ig (por ejemplo, PDB ID 1i85 que describe el complejo de CTLA4 y CD86). Se recolectaron los residuos de contacto intermolecular de cada "co-estructura" de cada PDB y se proyectaron sobre la secuencia de PVRIG. Se identificaron varias regiones con agrupaciones de residuos en interacción soportado por varios mapas de contacto y se sintetizaron como una serie de péptidos, y de forma razonable es de esperar que imiten la estructura de la proteína de longitud completa intacta y que con ello modulen uno o más de los efectos de la PVRIG sobre la inmunidad y sobre los tipos específicos de célula inmune. Según al menos algunas de las realizaciones de la invención, los fragmentos ECD de PVRIG representados por las secuencias de polipéptido enumeradas en la Figura 67 se localizan como se indica a continuación (en comparación con el ECD de PVRIG humana de la Figura 25, contando desde el primer aminoácido del ECD): Fragmento A de PVRIG, está localizado en las posiciones 46 a 66: Fragmento B de PVRIG, está localizado en las posiciones 46 a 79; Fragmento C de PVRIG, está localizado en las posiciones 63 a 79; Fragmento D de PVRIG, está localizado en las posiciones 91 a 106; Fragmento E de PVRIG, está localizado en las posiciones 91 a 114; Fragmento F de PVRIG, está localizado en las posiciones 11 a 25; Fragmento G de PVRIG, está localizado en las posiciones 3 a 24; Fragmento H de PVRIG, está localizado en las posiciones 18 a 36; Fragmento I de PVRIG, está localizado en las posiciones 29 a 52; Fragmento J de PVRIG, está localizado en las posiciones 73-98.

Tal como se indica en la presente memoria y se describe más detalladamente a continuación, los anticuerpos anti-PVRIG (que incluyen los fragmentos de unión a antígeno) que se unen a PVRIG y que evitan la activación por PVRL2 (p.ej., del modo más común, bloqueando la interacción de PVRIG y PVLR2), se usan para potenciar la activación de células T y/o células NK, y se usan para tratar enfermedades tales como el cáncer y la infección de patógenos.

III. Anticuerpos

Por consiguiente, la invención proporciona anticuerpos anti-PVRIG. PVRIG, también denominada Proteína que Contiene Dominio de Inmunoglobulina Relacionada con Receptor de Poliovirus, Q6DKI7 o C7orf15, se refiere a las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico mostradas en el identificador de acceso RefSeq NP_076975, mostrado

en la Figura 25. Los anticuerpos de la invención son específicos del dominio extracelular de PVRIG, tal como se detalla en la presente memoria.

Tal como se discute más adelante, el término “anticuerpo” se usa de forma general. Los anticuerpos que tienen uso en la presente invención pueden adoptar una serie de formatos como se describe en la presente memoria, que incluyen anticuerpos tradicionales, así como derivados de anticuerpos, fragmentos y miméticos, descritos más adelante. En general, el término “anticuerpo” incluye cualquier polipéptido que incluye al menos un dominio de unión a antígeno, como se describe más detalladamente más adelante. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, xenogénicos, alogénicos, singénicos o formas modificadas de los mismos, tal como se describe en la presente memoria, siendo particularmente útiles los anticuerpos monoclonales en muchas realizaciones. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen específicamente o de forma sustancialmente específica a moléculas de PVRIG. Los términos “anticuerpos monoclonales” y “composición de anticuerpos monoclonales”, tal como se usan en la presente memoria, se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular de un antígeno, mientras que el término “anticuerpos policlonales” y “composición de anticuerpos policlonales” se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interaccionar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpos monoclonales, típicamente presenta una única afinidad por un antígeno particular, con el cual inmunorreacciona.

Las unidades estructurales de anticuerpo de longitud completa tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada para con una cadena “ligera” (que presenta típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (que presenta 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 la clase IgG, que tiene varias subclases, que incluyen, aunque sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Por tanto, “isotipo” tal como se usa en la presente memoria significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Aunque los ejemplos de anticuerpos designados en la presente memoria como “CPA” se basan en regiones constantes pesadas de IgG1, tal como se muestra en la Figura 38, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención incluyen aquellos que usan secuencias de IgG2, IgG3 e IgG4, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, como es sabido en la técnica, diferentes isotipos de IgG tienen diferentes funciones efectoras que pueden ser deseables o no. Por consiguiente, los anticuerpos CPA de la invención también pueden cambiar los dominios constantes de IgG1 por dominios constantes de IgG2, IgG3 o IgG4 (mostrado en la Figura 66), siendo particularmente útiles la IgG2 y la IgG4 en una serie de situaciones, por ejemplo para facilitar la fabricación, o cuando se desea reducir la función efectora, siendo esto último lo deseado en algunas situaciones.

Para los anticuerpos enumerados de la designación CHA, éstos son anticuerpos de ratón generados en hibridomas (la designación “H”), y por tanto en general están humanizados como se conoce en la técnica, generalmente en las regiones estructurales (F1 a F4 de cada una de las regiones variables pesadas y ligeras), y después se injertan en dominios constantes pesados y ligeros de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana (mostrado en la Figura 66), nuevamente siendo particularmente útil la IgG4, tal como se describe detalladamente más adelante.

La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principales del reconocimiento de antígeno, referidos generalmente en la técnica y en la presente memoria como “dominio Fv” o “región Fv”. En la región variable, se reúnen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y de la cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles recibe el nombre de región determinante de la complementariedad (referido en la presente memoria a partir de ahora como “CDR”), donde la variación de la secuencia de aminoácidos es más significativa. “Variable” se refiere al hecho de que determinados segmentos de la región variable difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida uniformemente. En su lugar, las regiones V consiste en tiras relativamente invariantes denominadas regiones estructurales (FRs) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables”.

Cada VH y VL está compuesta de tres regiones hipervariables (“regiones determinantes de complementariedad”, “CDRs”) y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable generalmente abarca residuos de aminoácido de aproximadamente los residuos de aminoácido 24-34 (LCDR1; “L” denota cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y de aproximadamente 31-35B (HCDR1; “H” denota cadena pesada), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada, aunque a veces la numeración se desplaza ligeramente, como apreciarán los especialistas en la técnica; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5 th 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) de la región variable de cadena ligera, y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) de la región variable de cadena pesada; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917. Las CDRs específicas de la invención se describen a continuación y se muestran en la Figura 40.

La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante como responsable principal de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. En base al grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y la estructura y prepararon una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5 th edition, NIH publication, No. 91-3242, E. A. Kabat et al., incorporado en su plenitud a modo de referencia).

En la subclase IgG de inmunoglobulinas, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Con "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente memoria se pretende indicar una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. De interés en la presente invención son los dominios de cadena pesada, que incluyen, los dominios pesados constantes (CH) y los dominios de bisagra. En el contexto de anticuerpos de IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "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.

Por consiguiente, la invención proporciona dominios pesados variables, dominios ligeros variables, dominios constantes pesados, dominios ligeros constantes y dominios Fc para su uso tal como se describe en la presente memoria. Por "región variable" tal como se usa en la presente invención se pretende indicar la región de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes Vκ o Vγ, y/o VH que constituyen las localizaciones genéticas de inmunoglobulina kappa, lambda y de cadena pesada, respectivamente. Por consiguiente, el dominio pesado variable comprende vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4, y el dominio ligero variable comprende vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4. Por "región constante pesada" en la presente memoria se pretende indicar la porción de CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo. Por "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc" tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar el polipéptido que comprenden la región constante de un anticuerpo, excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal respecto a dichos 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 bisagra inferior entre Cγ1 (Cγ1) y Cγ2 (Cγ2). Aunque las fronteras de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente se define para incluir los residuos C226 o P230 respecto a su extremo carboxilo, donde la numeración es acorde al índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, tal como se describe detalladamente más adelante, se hacen modificaciones de aminoácido en la región Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn.

Por tanto, "variante de Fc" o "Fc variante" tal como se usan en la presente memoria pretenden indicar que comprende una modificación de aminoácido en un dominio de Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácido que las componen. Por tanto, por ejemplo, N434S o 434S es una variante Fc con una sustitución de serina en la posición 434 respecto al polipéptido Fc progenitor, donde la numeración es acorde al índice EU. Del mismo modo, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S respecto al polipéptido Fc progenitor. La identidad del aminoácido WT puede estar sin especificar, en cuyo caso la variante anteriormente mencionada se denomina 428L/434S. Cabe destacar que el orden en el que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, eso significa que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que M428L/N434S, etcétera. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención que se refieren a anticuerpos, a menos que se indique lo contrario, la numeración de la posición de aminoácido es acorde al índice EU.

Por "Fab" o "región Fab" tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab se puede referir a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fab. Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv" tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un único anticuerpo. Como apreciarán los especialistas en la técnica, éstos estarán constituidos de dos cadenas.

A lo largo de la presente especificación, generalmente se usa el sistema de numeración IMTG o el sistema de numeración Kabat cuando se refiere a un residuo del 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) (p.ej., Kabat et al., ver anterior (1991)). La numeración EU como en Kabat se usa generalmente para dominios constantes y/o en los dominios Fc.

Las CDRs contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno, o más específicamente, de unión a epítopo de los anticuerpos. "Epítopo" se refiere a un determinante que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico de la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Los epítopos son agrupamientos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente presentan características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un único antígeno puede tener más de un epítopo.

El epítopo puede comprender residuos de aminoácido implicados directamente en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácido, que no estén implicados directamente en la unión, tal como los residuos de aminoácido que son bloqueados de forma efectiva por el péptido de unión a antígeno específico; en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específico.

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

Un epítopo típicamente incluye 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 sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo “compartimentar”. Más adelante se describen los compartimentos o contenedores específicos.

Se incluye dentro de la definición de “anticuerpo” una “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (también usado de forma intercambiable con “fragmento de unión a antígeno”, “fragmento de anticuerpo” y “derivado de anticuerpo”). Es decir, para los propósitos de la invención, un anticuerpo de la invención tiene un requerimiento funcional mínimo de unirse a un antígeno de PVRIG. Como apreciarán los especialistas en la técnica, existe un número grande de fragmentos de antígeno y derivados de antígeno que retienen la capacidad de unirse a un antígeno y aun así presentan estructuras alternativas, que incluyen, aunque sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) los fragmentos F(ab’)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados, (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están ligados por un ligando peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird et al., 1988, Science 242: 423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883, incorporada en su plenitud a modo de referencia), (iv) “diacuerpos” o “triacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326: 461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448, todos incorporados en su plenitud a modo de referencia), (v) “anticuerpos de dominio” o “dAb” (algunas veces referidos como “dominio variable sencillo de inmunoglobulina”, que incluye dominios variables de anticuerpo individual de otras especies tal como roedor (por ejemplo, como se describe en WO 00/29004), tiburón nodriza y dAbs V-HH de camélido, (vi) SMPs (compuestos inmunofarmacéuticos de molécula pequeña), camelicuerpos, nanocuerpos e IgNAR.

Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo (fragmento de unión a antígeno, fragmento de anticuerpo, porción de anticuerpo) puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor (a veces referidas como “proteínas de fusión”), formadas mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Los ejemplos de moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región nuclear de la estreptavidina para fabricar una molécula scFv tetramérica y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para fabricar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas. Se puede preparar porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tal como digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante estándares, tal como se describe en la presente memoria.

En general, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención son recombinantes. “Recombinante” tal como se usa en la presente memoria, de forma amplia, en referencia a un producto, p.ej., una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o mediante la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que de otro modo son expresados anormalmente, sub-expresados o no expresados en absoluto.

El término “anticuerpo recombinante”, tal como se usa en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crea o aíslan mediante medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p.ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparados a partir de los mismos (descrito detalladamente más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedante transformada para expresar el anticuerpo humano, p.ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualesquier otros medios que implican la división de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes presentan regiones variables en las que las regiones estructurales y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, no obstante, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de secuencias V_H y V_L de línea germinal human, y están

relacionadas con ellas, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

A. Ingeniería de anticuerpos opcional

Los anticuerpos de la invención pueden ser modificados, o diseñados mediante ingeniería, para alterar las secuencias de aminoácidos mediante sustituciones de aminoácidos.

Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" en la presente memoria se pretende indicar el reemplazamiento de un aminoácido de una posición particular de una secuencia de polipéptidos progenitora por un aminoácido diferente. En particular, en algunas realizaciones, la sustitución es por un aminoácido que no existe de forma natural en la posición particular, que no existe de forma natural en el organismo o en ningún organismo. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico de la posición 272 es reemplazado por tirosina. Para mayor claridad, una proteína que ha sido modificada para cambiar la secuencia codificadora de ácido nucleico pero sin cambiar el aminoácido de partida (por ejemplo, cambiar CGG (que codifica arginina) por CGA (que sigue codificando arginina) para aumentar los niveles de expresión en el organismo hospedante) no es una "sustitución de aminoácido"; es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición concreta en la que originalmente estaba, no es una sustitución de aminoácido.

Tal como se discute en la presente memoria, se pueden realizar sustituciones de aminoácido para alterar la afinidad de las CDRs por la proteína PVRIG (que incluye tanto aumentar como reducir la unión, como se describe detalladamente más adelante), así como para alterar otras propiedades funcionales adicionales de los anticuerpos. Por ejemplo, se pueden modificar los anticuerpos para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la vida media en suero, fijación de complemento, unión a receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo según al menos algunas realizaciones de la invención puede ser modificado químicamente (p.ej., se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o puede ser modificado para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Dichas realizaciones se describen detalladamente más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de C_{H1} es modificada de tal modo que el número de residuos de cisteína de la región bisagra se ve alterado, p.ej., aumenta o disminuye. Esta estrategia se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. nº 5.677.425, de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína de la región bisagra de CH1 es alterada, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo es mutada para reducir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácido en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra de Fc, de tal modo que el anticuerpo presenta una unión disminuida a proteína A de *Staphylococcus* (SpA) respecto a la unión a SpA de dominio de bisagra-Fc. Esta estrategia se describe más detalladamente en la Patente de EE.UU. nº 6.165.745, de Ward et al.

En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácido se pueden realizar en la región Fc, en general para alterar la unión a receptores FcγR. Por "receptor gamma Fc", "FcγR" o "FcgammaR", tal como se usa en la presente memoria, se pretende indicar cualquier miembro de la familia de proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y que está codificada por un gen FcγR. En humanos, dicha familia incluye, aunque sin limitación, FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, incorporada en su plenitud a modo de referencia), así como cualquier FcγR humano no descubierto o cualesquier isoformas o alotipos humanos de FcγR no descubiertas. Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, que incluye, aunque sin limitación, humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγRs de ratón incluyen, aunque sin limitación, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII-1 (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcγR de ratón no descubierto o cualesquier isoformas o alotipos de ratón de FcγR no descubiertos.

Existe una serie de sustituciones Fc útiles que pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. Las sustituciones que dan como resultado un aumento de la unión, así como una reducción de la unión, pueden ser útiles. Por ejemplo, se sabe que un aumento de la unión a FcγRIIIa generalmente da como resultado un aumento de la ADCC (citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo; la reacción mediada celularmente en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo ligado en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana). De forma similar, una reducción de la unión a FcγRIIb (un receptor inhibidor) también puede ser beneficiosa en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácido que encuentran utilidad en la presente invención incluyen aquellas enumeradas en las Solicitudes de EE.UU. con nº de serie 11/124.620 (particularmente la Fig. 41), y en la Patente de EE.UU. nº 6.737.056, ambas se incorporan de forma expresa a la presente memoria a modo de referencia en su plenitud, y específicamente para las variantes descritas en las mismas. Las variantes particulares que presentan utilidad incluyen, aunque sin limitación, 236A, 239D, 239E,

332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 299T y 297N.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención se modifican para aumentar su vida media biológica. Es posible utilizar varias estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, tal como se describe en la Patente de EE.UU. nº 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, se puede alterar el anticuerpo dentro de la región C_{H1} o C_L para contener un epítopo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un domino CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las Patentes de EE.UU. nº 5.869.046 y 6.121.022, de Presta et al. Otras mutaciones adicionales para aumentar la vida media en suero se describen en las Patentes de EE.UU. nº 8.883.973, 6.737.056 y 7.371.826, e incluyen 428L, 434A, 434S y 428L/434S.

En otras realizaciones adicionales, la región Fc es alterada reemplazando al menos un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un residuo de aminoácido diferente, de tal modo que el anticuerpo presente una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector para el cual se altera la afinidad, por ejemplo, es un receptor de Fc o el componente C1 de complemento. Esta estrategia se describe más detalladamente en las Patentes de EE.UU. nº 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En otro ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácido 329, 331 y 322 por un residuo de aminoácido diferente, de tal modo que el anticuerpo presente una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o eliminada. Esta estrategia se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. nº 6.194.551, de Idusogie et al.

En otro ejemplo, se alteran uno o más residuos de aminoácido de las posiciones de aminoácido 231 y 239 para alterar con ello la capacidad del anticuerpo para fijar complemento. Esta estrategia se describe más detalladamente en la Publicación PCT WO 94/29351, de Bodmer et al.

En otro ejemplo adicional, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando 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 más detalladamente en la Publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión de IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R. L. et al. (2001) J Biol. Chem. 276: 6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 han demostrado mejorar la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se ha demostrado que los siguientes mutantes de combinación mejora la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Adicionalmente, mutaciones tales como M252Y/S254T/T256E o M428L/N434S mejoran la unión a FcRn y aumentan la vida media en circulación del anticuerpo (véase Chan CA y Carter PJ (2010) Nature Rev Immunol 10: 301-316).

En otra realización adicional, el anticuerpo puede modificarse para abolir el intercambio de brazo Fab *in vivo*. Específicamente, este proceso implica el intercambio de medias moléculas de IgG4 (una cadena pesada más una cadena ligera) entre otros anticuerpos IgG4 que da como resultado efectivamente anticuerpos biespecíficos que son funcionalmente monovalentes. Las mutaciones en la región bisagra y en los dominios constantes de la cadena pesada puede abolir dicho intercambio (véase Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, *Immunology* 105: 9-19).

En otra realización adicional, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por antígeno o para reducir una función efectora, tal como la ADCC. Dichas modificaciones de carbohidrato se pueden llevar a cabo, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo, por ejemplo N297. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácido que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la estructura de región variable para eliminar de este modo la glicosilación en dicho sitio.

Adicional o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo que presente un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que presente cantidades reducidas de residuos de fucosilo, o un anticuerpo que presente un aumento de estructuras GlcNac de bisección. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidrato se pueden llevar a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedante con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica, y pueden usarse como células hospedantes en las que expresar anticuerpos recombinantes de acuerdo a al menos algunas realizaciones de la invención, produciendo con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (α (1,6) fucosiltransferasa), de tal modo que en los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 falta fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares

Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8 son creadas mediante disrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazamiento (véase la Publicación de Patente de EE.UU. Nº 20040110704, de Yamane et al. y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22). Como ejemplo adicional, el documento EP 1.176.195 de Hanai et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de tal modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace α 1,6. Hanai et al. también describen líneas celulares que presentan baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, o que no presentan la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea de células CHO variante, las células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), dando como resultado también una hipofucosilación de anticuerpos expresados en dicha célula hospedante (véase también Shields, R. L. et al. (2002) *J Biol. Chem*. 277: 26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares modificadas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteína (p.ej., β(1,4)-N-acetilglucosaminil transferasa III (GnTIII)) de tal modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben un aumento de estructuras bisectantes GlcNac, lo que da como resultado un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al. (1999) *Nat. Biotech*. 17: 176-180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo se pueden eliminar usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa α-L-fucosidasa elimina residuos de fucosilo de anticuerpos (Tarentino, A. L. et al. (1975) *Biochem*. 14: 5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria que se contempla por la invención es la peguilación o la adición de otros restos solubles en agua, típicamente polímeros, p.ej., a fin de potenciar la vida media. Un anticuerpo puede peguilarse, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica (p.ej., en suero) del anticuerpo. Para peguilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilen glicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la peguilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se usa en la presente memoria, el término “polietilen glicol” pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que han sido usadas para derivatizar otras proteínas, tal como mono (C_1-C_{10}) alcoxi- o ariloxi-polietilen glicol o polietilen glicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a peguilar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para peguilar proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos según al menos algunas realizaciones de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura et al. y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Además de las sustituciones realizadas para alterar la afinidad de unión a FcγRs y/o FcRn y/o para aumentar la vida media en suero *in vivo*, se pueden realizar modificaciones de anticuerpo adicionales, tal como se describe más detalladamente a continuación.

En algunos casos, se realiza una maduración de afinidad. Las modificaciones de aminoácido en las CDRs a menudo se refieren como “maduración de afinidad”. Un anticuerpo “madurado de afinidad” es aquel que presenta una o más alteraciones en una o más CDRs, lo que da como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee dicha(s) alteración(es). En algunos casos, aunque raros, puede ser deseable reducir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno, pero esto generalmente no es lo preferible.

En algunas realizaciones, se realizan una o más modificaciones de aminoácido en una o más de las CDRs de los anticuerpos VISG1 de la invención. En general, solo 1 o 2 o 3 aminoácidos son sustituidos en cualquier CDR individual, y generalmente no se realizan más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios en un conjunto de CDRs. Sin embargo, debería apreciarse que cualquier combinación de no sustituciones, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR se puede combinar independientemente y opcionalmente con cualquier otra sustitución.

Se puede realizar una maduración de afinidad para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de PVRIG en al menos aproximadamente de 10% a 50-100-150% o más, o entre 1 y 5 veces en comparación con el anticuerpo “progenitor”. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos presentarán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno de PVRIG. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Marks et al., 1992, Biotechnology 10: 779-783, que describe la maduración de afinidad mediante un barajado de dominio de cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL). La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o estructurales se describe en: Barbas, et al. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169: 147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7): 3310-9; y Hawkins et al, 1992, J. Mol. Biol. 226: 889-896, por ejemplo.

Alternativamente, se pueden realizar modificaciones de aminoácido en una o más de las CDRs de los anticuerpos de la invención que están “silenciados”, p.ej., que no alteran significativamente la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Éstas se pueden realizar por una serie de razones, que incluyen optimizar la expresión (como puede hacerse para los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención).

Por tanto, dentro de la definición de las CDRs y los anticuerpos de la invención se incluyen CDRs y anticuerpos variantes; es decir, los anticuerpos de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácido en una o más de las CDRs de los anticuerpos enumerados de la invención. Adicionalmente, como se describe más adelante, también se

pueden realizar modificaciones de aminoácido de forma independiente y opcional en cualquier región fuera de las CDRs, que incluye las regiones estructurales y constantes.

IV. Anticuerpos de PVRIG

La presente invención proporciona anticuerpos anti-PVRIG. (Por conveniencia, se emplea indistintamente “anticuerpos anti-PVRIG” y “anticuerpos de PVRIG”). Los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se unen específicamente a PVRIG humana, y preferiblemente a la ECD de VISG1 humana, tal como se muestra en la Figura 25.

Se puede exhibir unión específica a PVRIG o a un epítopo de PVRIG, por ejemplo, con 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 de al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior, 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, 1000, 5000, 10000 veces mayor para una molécula de control en comparación con el antígeno o epítopo de PVRIG.

Sin embargo, tal como se muestra en los Ejemplos, para una unión óptima de PVRIG expresada sobre la superficie de células NK y T, los anticuerpos preferiblemente presentan una KD inferior a 50 nM y lo más preferiblemente inferior a 1 nM, encontrando utilidad en los métodos de la invención menos de 0,1 nM y menos de 1 pM y 0,1 pM.

Asimismo, la unión específica a un antígeno o epítopo particular puede ser exhibida, por ejemplo, por un anticuerpo que presenta una KA o Ka para un antígeno o epítopo de PVRIG de al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 veces mayor para el epítopo en comparación con 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 humana con una K_D de 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, o 1 nM o menos (es decir, mayor afinidad de unión), o de 1 pM o menos, donde K_D se determina mediante métodos conocidos, p.ej., resonancia de plasmón superficial (SPR, p.ej., ensayos Biacore), ELISA, KINEXA y lo más típicamente SPR a 25ºC o 37ºC.

A. Anticuerpos anti-PVRIG específicos

La invención proporciona dominios de unión a antígeno, que incluyen anticuerpos de longitud completa, que contienen una serie de conjuntos de 6 CDRs específicos enumerados.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria son etiquetados con se indica a continuación. Los anticuerpos tienen números de referencia, por ejemplo “CPA.7.013”. Estos representan la combinación de las cadenas pesada variable y ligera variable, tal como se muestra en la Figura 38 y la Figura 39, por ejemplo. "CPA.7.013.VH" se refiere a la porción pesada variable de CPA.7.013, mientras que "CPA.7.013.VL" es la cadena ligera variable. "CPA.7.013.vhCDR1", "CPA.7.013.vhCDR2", "CPA.7.013.vhCDR3", "CPA.7.013.vlCDR1", "CPA.7.013.vlCDR2", y "CPA.7.013.vlCDR3", se refieren a las CDRs indicadas. “CPA.7.013.HC” se refiere a la cadena pesada completa (p.ej., dominio variable y constante) de dicha molécula, y “CPA.7.013.LC” se refiere a la cadena ligera completa (p.ej., dominio variable y constante) de la misma molécula. “CPA.7.013.H1” se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios variables pesado y ligero, que incluye el dominio constante de IgG1 humana (por tanto, el H1; las secuencias de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en la Figura 66). Por consiguiente, “CPA.7.013.H2” serían los dominios variables de CPA.7.013 ligados a IgG2 humana. “CPA.7.013.H3” serían los dominios variables de CPA.7.013 ligados a IgG3 humana, y “CPA.7.013.H4” serían los dominios variables de CPA.7.013 ligados a IgG4 humana.

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

Adicionalmente, la presente descripción proporciona una serie de anticuerpos CHA, que son anticuerpos de ratón generados a partir de hibridomas. Como es bien conocido en la técnica, las seis CDRs son útiles cuando se introducen en las regiones estructurales variable pesada y variable ligera, o cuando los dominios variables pesado y ligero son humanizados.

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos, normalmente de longitud completa o dominios scFv, que comprenden los siguientes conjuntos CHA de CDRs, cuyas secuencias se muestran en la Figura 41:

CHA.7.502.vhCDR1, CHA.7.502.vhCDR2, CHA.7.502.vhCDR3, CHA.7.502.vlCDR1, CHA.7.502.vlCDR2, y CHA.7.502.vlCDR3.

CHA.7.503.vhCDR1, CHA.7.503.vhCDR2, CHA.7.503.vhCDR3, CHA.7.503.vlCDR1, CHA.7.503.vlCDR2, y CHA.7.503.vlCDR3.

CHA.7.506.vhCDR1, CHA.7.506.vhCDR2, CHA.7.506.vhCDR3, CHA.7.506.vlCDR1, CHA.7.506.vlCDR2, y CHA.7.506.vlCDR3.

CHA.7.508.vhCDR1, CHA.7.508.vhCDR2, CHA.7.508.vhCDR3, CHA.7.508.vlCDR1, CHA.7.508.vlCDR2, y CHA.7.508.vlCDR3.

CHA.7.510.vhCDR1, CHA.7.510.vhCDR2, CHA.7.510.vhCDR3, CHA.7.510.vlCDR1, CHA.7.510.vlCDR2, y CHA.7.510.vlCDR3.

CHA.7.512.vhCDR1, CHA.7.512.vhCDR2, CHA.7.512.vhCDR3, CHA.7.512.vlCDR1, CHA.7.512.vlCDR2, y CHA.7.512.vlCDR3.

CHA.7.514.vhCDR1, CHA.7.514.vhCDR2, CHA.7.514.vhCDR3, CHA.7.514.vlCDR1, CHA.7.514.vlCDR2, y CHA.7.514.vlCDR3.

CHA.7.516.vhCDR1, CHA.7.516.vhCDR2, CHA.7.516.vhCDR3, CHA.7.516.vlCDR1, CHA.7.516.vlCDR2, y CHA.7.516.vlCDR3.

CHA.7.518.vhCDR1, CHA.7.518.vhCDR2, CHA.7.518.vhCDR3, CHA.7.518.vlCDR1, CHA.7.518.vlCDR2, y CHA.7.518.vlCDR3.

CHA.7.520_1.vhCDR1, CHA.7.520_1.vhCDR2, CHA.7.520_1.vhCDR3, CHA.7.520_1.vlCDR1, CHA.7.520_1.vlCDR2, y CHA.7.520_1.vlCDR3.

CHA.7.520_2.vhCDR1, CHA.7.520_2.vhCDR2, CHA.7.520_2.vhCDR3, CHA.7.520_2.vlCDR1, CHA.7.520_2.vlCDR2, y CHA.7.520_2.vlCDR3.

CHA.7.522.vhCDR1, CHA.7.522.vhCDR2, CHA.7.522.vhCDR3, CHA.7.522.vlCDR1, CHA.7.522.vlCDR2, y CHA.7.522.vlCDR3.

CHA.7.524.vhCDR1, CHA.7.524.vhCDR2, CHA.7.524.vhCDR3, CHA.7.524.vlCDR1, CHA.7.524.vlCDR2, y CHA.7.524.vlCDR3.

CHA.7.526.vhCDR1, CHA.7.526.vhCDR2, CHA.7.526.vhCDR3, CHA.7.526.vlCDR1, CHA.7.526.vlCDR2, y CHA.7.526.vlCDR3.

CHA.7.527.vhCDR1, CHA.7.527.vhCDR2, CHA.7.527.vhCDR3, CHA.7.527.vlCDR1, CHA.7.527.vlCDR2, y CHA.7.527.vlCDR3.

CHA.7.528.vhCDR1, CHA.7.528.vhCDR2, CHA.7.528.vhCDR3, CHA.7.528.vlCDR1, CHA.7.528.vlCDR2, y CHA.7.528.vlCDR3.

CHA.7.530.vhCDR1, CHA.7.530.vhCDR2, CHA.7.530.vhCDR3, CHA.7.530.vlCDR1, CHA.7.530.vlCDR2, y CHA.7.530.vlCDR3.

CHA.7.534.vhCDR1, CHA.7.534.vhCDR2, CHA.7.534.vhCDR3, CHA.7.534.vlCDR1, CHA.7.534.vlCDR2, y CHA.7.534.vlCDR3.

CHA.7.535.vhCDR1, CHA.7.535.vhCDR2, CHA.7.535.vhCDR3, CHA.7.535.vlCDR1, CHA.7.535.vlCDR2, y CHA.7.535.vlCDR3.

CHA.7.537.vhCDR1, CHA.7.537.vhCDR2, CHA.7.537.vhCDR3, CHA.7.537.vlCDR1, CHA.7.537.vlCDR2, y CHA.7.537.vlCDR3.

CHA.7.538_1.vhCDR1, CHA.7.538_1.vhCDR2, CHA.7.538_1.vhCDR3, CHA.7.538_1.vlCDR1, CHA.7.538_1.vlCDR2, y CHA.7.538_1.vlCDR3.

CHA.7.538_2.vhCDR1, CHA.7.538_2.vhCDR2, CHA.7.538_2.vhCDR3, CHA.7.538_2.vlCDR1, CHA.7.538_2.vlCDR2, y CHA.7.538_2.vlCDR3.

CHA.7.543.vhCDR1, CHA.7.543.vhCDR2, CHA.7.543.vhCDR3, CHA.7.543.vlCDR1, CHA.7.543.vlCDR2, y CHA.7.543.vlCDR3.

CHA.7.544.vhCDR1, CHA.7.544.vhCDR2, CHA.7.544.vhCDR3, CHA.7.544.vlCDR1, CHA.7.544.vlCDR2, y CHA.7.544.vlCDR3.

CHA.7.545.vhCDR1, CHA.7.545.vhCDR2, CHA.7.545.vhCDR3, CHA.7.545.vlCDR1, CHA.7.545.vlCDR2, y CHA.7.545.vlCDR3.

CHA.7.546.vhCDR1, CHA.7.546.vhCDR2, CHA.7.546.vhCDR3, CHA.7.546.vlCDR1, CHA.7.546.vlCDR2, y CHA.7.546.vlCDR3.

CHA.7.547.vhCDR1, CHA.7.547.vhCDR2, CHA.7.547.vhCDR3, CHA.7.547.vlCDR1, CHA.7.547.vlCDR2, y CHA.7.547.vlCDR3.

CHA.7.548.vhCDR1, CHA.7.548.vhCDR2, CHA.7.548.vhCDR3, CHA.7.548.vlCDR1, CHA.7.548.vlCDR2, y CHA.7.548.vlCDR3.

CHA.7.549.vhCDR1, CHA.7.549.vhCDR2, CHA.7.549.vhCDR3, CHA.7.549.vlCDR1, CHA.7.549.vlCDR2, y CHA.7.549.vlCDR3.

CHA.7.550.vhCDR1, CHA.7.550.vhCDR2, CHA.7.550.vhCDR3, CHA.7.550.vlCDR1, CHA.7.550.vlCDR2, y CHA.7.550.vlCDR3.

Adicionalmente, las regiones estructurales de las cadenas variable pesada y variable ligera se pueden humanizar como es conocido en la técnica (generando variantes ocasionales en las CDRs, si es necesario), y por tanto se pueden generar variantes humanizadas de las cadenas VH y VL de la Figura 41. Adicionalmente, los dominios humanizados variables pesado y ligero pueden fusionarse entonces con regiones constantes humanas, tal como las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En particular, tal como se conoce en la técnica, se pueden humanizar cadenas VH y VL de ratón como se conoce en la técnica, por ejemplo, usando el programa IgBLAST de la página web de NCBI, tal como se describe en Y e et al. Nucleic Acids Res. 41: W34-W40 (2013), incorporado a la presente memoria a modo de referencia en su plenitud para los métodos de humanización. IgBLAST toma una secuencia VH y/o VL de ratón y la compara con una biblioteca de secuencias de línea germinal humana conocidas. Tal como se muestra en la presente memoria, para las secuencias humanizadas generadas en la presente memoria, las bases de datos usados fueron genes VH humanos IMGT (F+ORF, 273 secuencias de línea germinal) y genes VL kappa humanos IMGT (F+ORF, 74 secuencias de línea germinal). Se eligieron cinco secuencias CHA ejemplares: CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1, CHA.7.538_2 y CHA.7.524 (véase la Figura 41 para las secuencias VH y VL). Para esta humanización, se eligió IGHV1-46(alelo1) de línea germinal humana para las 5 como secuencia aceptora y la región de unión IGHJ4(alelo1) de cadena pesada humana (gen J). Para tres de las cuatro (CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2), se eligió IGKV1-39(alelo 1) de línea germinal humana como secuencia aceptora y se eligió IGKJ2(alelo1) de cadena ligera humana (gen J). El gen J se eligió entre secuencias de región de unión compiladas en IMGT® el sistema de información ImMunoGeneTics, en www.imgt.org. Las CDRs se definieron según la definición de AbM (véase www.bioinfo.org.uk/abs/). Las Figuras 88 muestran secuencias humanizadas, así como algunos cambios potenciales para optimizar la unión a PVRIG.

Los anticuerpos humanizados específicos de anticuerpos CHA incluyen los mostrados en las Figuras 88, las Figuras 89 y la Figura 90. Como apreciarán los especialistas en la técnica, cada secuencia pesada variable humanizada (Pesada Humanizada; HH) y ligera variable humanizada (Ligera Humanizada, HL) puede combinarse con las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Es decir, CHA.7.518.HH1 es la primera cadena pesada variable humanizada, y CHA.7.518.HH1.1 es la cadena pesada de longitud completa, que comprende la secuencia humanizada “HH1” con una región constante de IgG1 (CHA.7.518.HH1.2 es CHA.7.518.HH1 con IgG2, etc.).

Las secuencias de proteína de la presente invención pueden usarse adicionalmente como “secuencia de consulta” para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden llevar a cabo usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J Mol. Biol*. 215: 403-10. Las búsquedas de proteína BLAST se pueden realizar 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 con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res*. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p.ej., XBLAST y NBLAST).

B. Generación de anticuerpos adicionales

Se pueden preparar anticuerpos adicionales para PVRIG humana como es bien conocido en la técnica, usando métodos bien conocidos tales como los descritos en los ejemplos. De esta manera, se pueden generar anticuerpos anti-PVRIG adicionales mediante métodos tradicionales tales como inmunizando ratones (a veces usando inmunización de ADN, por ejemplo, tal como se usa en Aldevron), seguido de cribado contra proteína PVRIG humana y generación de hibridomas, con purificación y recuperación de los anticuerpos.

V. Composiciones de ácido nucleico

También se proporcionan composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-PVRIG de la invención, así como vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos y las células hospedantes transformadas con las

composiciones de ácido nucleico y/o vector de expresión. Como apreciarán los expertos en la técnica, las secuencias de proteínas descritas en este documento pueden codificarse por cualquier número de posibles secuencias de ácido nucleico, debido a la degeneración del código genético.

Las composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos PVRIG 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 otro que codifica la cadena ligera. Estos se pueden poner en un único vector de expresión o dos vectores de expresión, como se conoce en la técnica, transformados en células hospedantes, donde se expresan para formar los anticuerpos de la invención. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando se usan constructos scFv, generalmente se usa un único ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable-ligando-cadena pesada ligera, que se puede insertar en un vector de expresión para la transformación en células hospedantes. Los ácidos nucleicos se pueden poner en vectores de expresión que contienen las secuencias de control transcripcionales y translacionales apropiadas, que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de señal y secreción, secuencias reguladoras, promotores, orígenes de replicación, genes de selección, etc.

Las células hospedantes de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO), PER.C6, HEK293 y otros como se conoce en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aísla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica apartado de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican la V_H- y V_L están operativamente ligados a otro fragmento que codifica un ligando flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3, de modo que las secuencias V_H y V_L se pueden expresar como una proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el ligando flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348: 552-554).

VI. Formulaciones de anticuerpos anti-PVRIG

Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los anteriores métodos se pueden formular 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 anti-tumoral de la composición terapéutica y de forma general es no-reactivo con el sistema inmunitario del paciente. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de una serie de vehículos farmacéuticos estándares tales como disoluciones de salino tamponado con fosfato, agua bacteriostática, y similares (véase, de forma general, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980). Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, butil orbenzil alcohol; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; rellenos tales como celulosa microcristalina, lactosa, almidones de maíz y otros; complejos metálicos (p.ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG).

En una realización preferida, la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención puede estar en una forma soluble en agua, tal como estar presente como sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluya tanto sales de adición ácida como básica. “Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son indeseables biológicamente, o de cualquier otra forma, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las “sales de adición básica farmacéuticamente aceptables” incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, y similares. Son particularmente preferidas las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tal como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina,

tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* preferiblemente son estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril o mediante otros métodos.

La administración de la composición farmacéutica que comprende anticuerpos de la presente invención, preferiblemente en la forma de una disolución acuosa estéril, se puede realizar en una variedad de formas, que incluyen, aunque sin limitación, subcutáneamente e intravenosamente. La administración subcutánea puede ser preferible en algunas circunstancias porque el paciente puede auto-administrarse la composición farmacéutica. Muchos agentes terapéuticos proteínicos no son suficientemente potentes para permitir una formulación de una dosis terapéuticamente efectiva en el volumen máximo aceptable para la administración subcutánea. Este problema se puede solventar en parte mediante el uso de formulaciones de proteínas que comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato (ver el documento WO 04091658). Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden ser más susceptibles de administración subcutánea debido a, por ejemplo, una mayor potencia, mejor vida media en suero o mayor solubilidad.

Como es sabido en la técnica, los agentes terapéuticos proteínicos a menudo se administran mediante infusión IV o de bolo. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden administrar usando dichos métodos. Por ejemplo, la administración puede ser venosa mediante infusión intravenosa con cloruro sódico al 0,9% como vehículo de infusión.

Adicionalmente, se puede usar cualquiera de una serie de sistemas de administración conocidos en la técnica para administrar las variantes Fc de la presente invención. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (p.ej., microesferas de PLA/PGA), y similares. Alternativamente, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material o matriz polimérica tal como poliésteres, hidrogeles, poli(vinil alcohol), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, acetato de etilen-vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT.RTM., y ácido poli-D-(-)-3-hidroxiburírico. Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunliposomas. Un liposoma es una vesícula pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77: 4030; Patente de EE.UU. nº 4.485.045; Patente de EE.UU. nº 4.544.545; y solicitud internacional de patente PCT WO 97/38731. En la Patente de EE.UU. nº 5.013.556 se describen liposomas con tiempo en circulación mejorado. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una conformación bicapa, similar a la disposición de lípidos en las membranas biológicas. Los liposomas particularmente útiles pueden ser generados mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido para dar lugar a liposomas con el diámetro deseado. Dentro del liposoma se puede contener opcionalmente un agente quimioterapéutico u otro agente terapéuticamente activo (Gabizon et al., 1989, J National Cancer Inst 81: 1484).

Los anticuerpos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas mediante métodos que incluyen, aunque sin limitación, técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, usando hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli-(metilmetacilato), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), y macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980. Se pueden fabricar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos, matrices que están en la forma de artículos conformados, p.ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT.RTM. (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, y ProLease.RTM. (disponible comercialmente en Alkermes), que es un sistema de administración basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada a una matriz de poli-DL-lactida-co-glicolide (PLG).

Las cantidades y las frecuencias de las dosis de administración se seleccionan, en una realización preferida, para ser terapéutica o profilácticamente efectivas. Como es sabido en la técnica, puede ser necesario realizar ajustes por la degradación de proteína, administración sistémica en lugar de localizada, y la velocidad de nueva síntesis de proteasa, así como la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y los especialistas en la técnica los podrán determinar mediante una experimentación rutinaria.

La concentración del anticuerpo en la formulación puede variar entre aproximadamente 0,1 y 100% en peso. En una realización preferida, la concentración de la variante Fc está en el rango de 0,003 a 1,0 molar. A fin de tratar a un paciente, se puede administrar una dosis terapéuticamente efectiva de la variante Fc de la presente invención. Por “dosis terapéuticamente efectiva” en la presente memoria se pretende indicar una dosis que produce los efectos para

los cuales es administrada. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá ser determinada por el especialista en la técnica usando técnicas conocidas. Las dosis pueden oscilar entre 0,0001 y 100 mg/kg de peso corporal o superior, por ejemplo 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal, siendo preferible de 1 a 10 mg/kg.

VII. Métodos para usar los anticuerpos anti-PVRIG

Una vez fabricados, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención pueden utilizarse en una serie de aplicaciones diferentes.

A. Usos terapéuticos

Los anticuerpos anti-PVRIG de la invención son útiles para tratar pacientes, tales como sujetos humanos, generalmente con una afección asociada a PVRIG. El término “tratamiento” tal como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, lo que se refiere al tratamiento del cáncer. Aquellos que necesitan el tratamiento incluyen los que ya padecen cáncer, así como los que se quiere prevenir el cáncer. Por lo tanto, el mamífero en tratamiento en la presente memoria ha sido diagnosticado con cáncer o puede estar predispuesto o ser susceptible a padecer el cáncer. Tal como se usa en la presente memoria, “tratar” se refiere a prevenir, retrasar el inicio, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir, detener los efectos perjudiciales o estabilizar los síntomas discernibles de las enfermedades, trastornos o afecciones cancerosas descritas anteriormente. También incluye la gestión del cáncer como se ha indicado anteriormente. Por “gestión” se pretende indicar reducir la gravedad de la enfermedad, reducir la frecuencia de los episodios de la enfermedad, reducir la duración de dichos episodios, reducir la gravedad de dichos episodios, frenar/reducir el crecimiento o proliferación de células cancerosas, frenar la progresión de al menos un síntoma, aliviar al menos un parámetro físico medible, y similares. Por ejemplo, las moléculas inmunes anti-PVRIG inmunoestimuladoras deberían promover la inmunidad de células T o NK o citoquinas contra células diana, p.ej., de cáncer, y con ello tratar el cáncer agotando las células implicadas en la condición de enfermedad.

Los anticuerpos de PVRIG de la invención se proporcionan en dosis terapéuticamente efectivas. Una “dosis terapéuticamente efectiva” de una molécula inmune anti-PVRIG según al menos algunas realizaciones de la presente invención preferiblemente da como resultado una reducción de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de la enfermedad, un aumento de la esperanza de vida, remisión de la enfermedad, o una prevención o reducción del perjuicio o incapacidad debida a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores positivos en PVRIG, una “dosis terapéuticamente efectiva” preferiblemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento del tumor en al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 60%, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, dicha inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el especialista en la técnica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otro modo aliviar los síntomas en un sujeto.

Un especialista en la técnica sería capaz de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o la ruta de administración seleccionadas.

1. Tratamiento de cáncer

Los anticuerpos de PVRIG de la invención tienen utilidad particular en el tratamiento del cáncer. En general, los anticuerpos de la invención son inmunomoduladores, ya que más que atacar directamente a las células cancerosas, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención estimulan el sistema inmunitario, generalmente a través de la inhibición de la acción de PVRIG. Por tanto, al contrario que las terapias dirigidas a tumor, que tienen como objetivo la inhibición de rutas moleculares que son cruciales para el crecimiento y el desarrollo del tumor, y/o el agotamiento de células tumorales, la inmunoterapia de cáncer está dirigida a estimular el propio sistema inmunitario del paciente para eliminar las células cancerosas, proporcionando una destrucción tumoral duradera. Se pueden usar varias estrategias en la inmunoterapia de cáncer, entre ellas se encuentran las vacunas contra el cáncer para inducir respuestas de células T específicas de tumor, y los anticuerpos inmunoestimuladores (es decir, antagonistas de los receptores inhibidores = puntos de control inmune) para eliminar rutas inmunosupresoras.

Las respuestas clínicas con terapia dirigida o terapias anti-cáncer convencionales tienden a ser transitorias ya que las células cancerosas desarrollan resistencia, y se produce una recurrencia del tumor. Sin embargo, el uso clínico de la inmunoterapia de cáncer en los últimos años ha demostrado que este tipo de terapia puede dar lugar a respuestas clínicas duraderas, mostrando un impacto drástico sobre la supervivencia a largo plazo. Sin embargo, aunque las respuestas son duraderas, solo un pequeño número de pacientes responden (al contrario que en la terapia convencional o dirigida, donde responde un gran número de paciente, si bien las respuestas son transitorias).

En el momento en que un tumor es detectado clínicamente, ya ha evadido al sistema inmunitario de defensa, adquiriendo propiedades inmunorresistentes e inmunosupresoras y creando un microentorno tumoral inmunosupresor a través de varios mecanismos y de una variedad de células inmunes.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención son útiles para tratar el cáncer. Debido a la naturaleza de un mecanismo de acción inmuno-oncológico, la PVRIG no tiene necesidad de sobreexpresarse o correlacionarse con un tipo de cáncer particular; es decir, la meta es hacer que los anticuerpos anti-PVRIG des-supriman la activación de células T y de células NK, de tal modo que el sistema inmunitario persiga a los cánceres.

"Cáncer", tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva o metastásica) que se caracteriza por una división celular anormal e incontrolada que produce un crecimiento o tumor maligno (p.ej., crecimiento celular desregulado). El término "cáncer" o "canceroso" tal como se usa en la presente memoria debería entenderse que contempla cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva, no invasiva o metastásica) que se caracteriza por una división celular anormal e incontrolada que produce un crecimiento o tumor maligno, describiéndose en la presente memoria ejemplos no limitativos de los mismos. Esto incluye cualquier afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer se ejemplifican en los ejemplos de trabajo y también se describen en la presente especificación.

Los ejemplos no limitativos de cáncer que puede ser tratado usando anticuerpos anti-PVRIG incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (que incluye cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de célula B (que incluye linfoma no de Hodgkin (NHL) de bajo grado/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL de grado difuso intermedio; NHL inmunoblástico de grado elevado; NHL linfoblástico de grado elevado; NHL de célula no separada pequeño de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de célula de manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de célula vellosa; leucemia mieloblástica crónica; mieloma múltiple y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD).

Otros cánceres susceptibles de tratamiento mediante la presente invención incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoideas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer colorrectal, de vejiga, de ovario, melanoma, cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (que incluye cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de célula B (que incluye linfoma no de Hodgkin (NHL) de bajo grado/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL de grado difuso intermedio; NHL inmunoblástico de grado elevado; NHL linfoblástico de grado elevado; NHL de célula no separada pequeño de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de célula de manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de célula vellosa; leucemia mieloblástica crónica; mieloma múltiple y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada a facomatosis, edema (tal como los asociados a tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer rectal, cáncer de pulmón de célula no pequeña, linfoma no de Hodgkin (NHL), cáncer de célula renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, y mieloma múltiple. En un ejemplo de realización, el cáncer es un cáncer temprano o avanzado (que incluye metastásico) de vejiga, ovario o un melanoma. En otra realización, el cáncer es cáncer colorrectal. Las afecciones cancerosas susceptibles de tratamiento de la invención incluyen cánceres que expresan o que no expresan PVRIG y además incluyen cánceres no metastásicos o no invasivo, así como invasivos y metastásicos, donde la expresión de PVRIG por parte de células inmunes, estromales o enfermas suprime las respuestas antitumorales y las respuestas inmunes anti-invasivas. El método de la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de tumores vascularizados.

Tal como se muestra en los Ejemplos, la PVRIG es sobreexpresada y/o se correlaciona con la infiltración de linfocitos tumoral (como demuestra la correlación con la expresión de CD3, CD4, CD8 y PD-1) en una serie de tumores diferentes de orígenes diversos, y por tanto es útil en el tratamiento de cualquier cáncer, que incluye, aunque sin limitación, 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 tiroideo, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma

de célula escamosa y basal), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (linfoma no de Hodgkin (NHL) y linfoma de Hodgkin (HD)), leucemia mieloide aguda (AML),) leucemia linfoblástica aguda de célula T (T-ALL), linfoma de célula B grande difusa, tumores de célula germinal testicular, mesotelioma y cáncer esofágico.

"Terapia de cáncer" en la presente memoria se refiere a cualquier método que previene o trata un cáncer, o que alivia uno o más de los síntomas del cáncer. Típicamente, dichas terapias comprenderán la administración de anticuerpos anti-PVRIG inmunoestimuladores (que incluyen fragmentos de unión a antígeno) tanto solos como en combinación con quimioterapia o radioterapia u otros agentes biológicos para mejorar su actividad, es decir, en individuos en los que la expresión de PVRIG suprime las respuestas antitumorales y la eficacia de la quimioterapia o la radioterapia o la eficacia biológica.

2. Terapias de combinación en cáncer

Como es sabido 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 condición de enfermedad, resultan muy prometedoras. Por ejemplo, en el área de la inmunoterapia, existe una serie de terapias de combinación prometedoras que usan un agente quimioterapéutico (tanto un fármaco de molécula pequeña como un anticuerpo anti-tumoral) con anticuerpos inmuno-oncológicos como el anti-PD-1, y como tal, los anticuerpos anti-PVRIG descritos en la presente memoria pueden ser sustituidos del mismo modo. Se puede usar cualquier agente quimioterapéutico que exhiba actividad anti-cáncer de acuerdo a la presente invención; en la especificación se describen varios ejemplos no limitativos.

El fundamento científico subyacente para el aumento drástico de la eficacia de la terapia de combinación reivindica que el bloqueo del punto de control inmune como monoterapia inducirá regresiones tumorales solo cuando existe una respuesta inmune anti-tumoral pre-existente fuerte que pueda ser "liberada" cuando se bloquea la ruta. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes y tipos de tumores, las respuestas inmunes anti-tumorales endógenas son débiles, y por tanto se requiere una inducción de inmunidad anti-tumoral para que el bloqueo del punto de control inmune sea efectivo, tal como muestra la Figura 1. Según al menos algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos específicos de PVRIG, fragmentos de anticuerpo, conjugados y composiciones que los comprenden, se usan para el tratamiento de todos los tipos de cáncer en inmunoterapia de cáncer en terapia de combinación.

Los términos "en combinación con" y "co-administración" no se limitan a la administración de dichos agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo. En su lugar, se pretende que el anticuerpo anti-PVRIG y el otro agente o agentes se administren en una secuencia, y en un intervalo de tiempo, tales que puedan actuar juntos para proporcionar un beneficio que se ve aumentado en comparación con el tratamiento solo con anticuerpo anti-PVRIG de la presente invención o solo con el otro agente o agentes. Se prefiere que el anticuerpo anti-PVRIG y el otro agente o agentes actúen aditivamente, y especialmente se prefiere que actúen sinérgicamente. Dichas moléculas se presentan de forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido. El médico responsable puede determinar empíricamente, o considerando la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como el calendario 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 adicionales. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para mejorar la eficacia o la seguridad del anticuerpo anti-PVRIG. Asimismo, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para tratar la misma enfermedad o comorbilidad, más que para alterar la acción del anticuerpo de PVRIG. Por ejemplo, un anticuerpo de PVRIG de la presente invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o ambas, quimioterapia y terapia de radiación.

Los anticuerpos de PVRIG de la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, que incluyen, aunque sin limitación, 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 angiogénesis, inhibidores de proteína tirosina quinasa (PTK), u otros agentes terapéuticos.

Según al menos algunas realizaciones, las moléculas inmunes anti PVRIG podrían usarse en combinación con cualquiera de las conocidas en la técnica estándar de tratamiento de cuidado del cáncer (como puede encontrarse, por ejemplo, en http://www.cancer.gov/cancertopics).

Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti PVRIG combinado con al menos un agente terapéutico o inmuno modulador adicional, otros compuestos o inmunoterapias, o estrategias inmunoestimuladoras como las descritas en la presente memoria, que incluye, aunque sin limitación, vacunas tumorales, terapia de célula T adoptiva, agotamiento de Treg, anticuerpos (p.ej., bevacizumab, Erbitux), péptidos, pepti-cuerpos, moléculas pequeñas, agentes quimioterapéuticos tales como agentes citotóxicos y citostáticos (p.ej., paclitaxel, cisplatino, vinorelbina, docetaxel, gemcitabina, temozolomide, irinotecan, 5FU, carboplatino), modificadores inmunológicos tales como interferones e interleucinas, anticuerpos inmunoestimuladores, hormonas del crecimiento u otras citoquinas,

ácido fólico, vitaminas, minerales, inhibidores de aromatasa, ARNi, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de proteasa, doxorrubicina (Adrimicina), cisplatino bleomicina sulfato, carmustina, clorambucilo e ciclofosfamida hidroxiurea que, por sí mismas, solo son efectivas en niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra intravenosamente a 100 mg/dosis una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra intravenosamente a 60-75 mg/mL una vez cada 21 días.

Según al menos algunas realizaciones de la presente invención, los agentes terapéuticos que se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-PVRIG son agentes potenciadores que aumentan las respuestas anti-tumorales, p.ej., otros anticuerpos anti-punto de control inmune u otros agentes potenciadores que se activan principalmente para aumentar respuestas anti-tumorales endógenas, tales como radioterapia, crioterapia, quimioterapia convencional/clásica que potencia respuestas inmunes anti-tumorales, terapia dirigida que potencia respuestas inmunes anti-tumorales, terapia anti-angiogénica, agentes terapéuticos dirigidos a células inmunosupresoras tales como Tregs y MDSCs, anticuerpos inmunoestimuladores, terapia de citoquinas, vacunas de cáncer terapéuticas, transferencia de células adoptivas.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con bisfosfonatos, especialmente amino-bisfosfonatos (ABP), que han demostrado presentar actividad anticancerígena. Algunas de las actividades asociadas a los ABPs son sobre células γδT humanas que cubren la interfaz de la inmunidad innata y adaptativa y que presentan una potente actividad antitumoral.

Las terapias dirigidas también pueden estimular la respuesta inmune específica de tumor induciendo la muerte inmunogénica de células tumorales, o alterando mecanismos efectores inmunes (Galluzzi et al, 2012, *Nature Reviews -Drug discovery*, Volumen 11, páginas 215-233).

Según al menos algunas realizaciones de la invención, en la presente memoria se describen terapias dirigidas usadas como agentes para combinación con moléculas inmunes anti PVRIG para el tratamiento de cáncer.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con agentes terapéuticos dirigidos a células inmunosupresoras reguladoras tales como células T reguladoras (Tregs) y células supresoras derivadas de mieloide (MDSCs). Una serie de agentes quimioterapéuticos usados habitualmente ejercen una acción no específica de Tregs y reducen el número o la capacidad inmunosupresora de las Tregs o las MDSCs (Facciabene A. et al 2012 *Cancer Res*; 72(9) 2162-71; Byrne WL. et al 2011, *Cancer Res.* 71: 691520; Gabrilovich DI. y Nagaraj S, *Nature Reviews* 2009 Volumen 9, páginas 162-174). A este respecto, la terapia metronómica con algunos fármacos de quimioterapia da como resultado efectos inmunoestimuladores en lugar de inmunosupresores, a través de la modulación de células reguladoras. Por tanto, según al menos algunas realizaciones de la presente invención, la molécula inmune anti-PVRIG para inmunoterapia de cáncer se usa en combinación con fármacos seleccionados, aunque sin limitación, entre ciclofosfamida, gemcitabina, mitoxantrona, fludarabina, docetaxel, paclitaxel, talidomida y derivados de talidomida.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PVRIG se usan en combinación con nuevos agentes dirigidos específicos de Treg que incluyen: 1) anticuerpos agotadores o asesinos que atacan directamente a Tregs a través del reconocimiento de receptores superficiales de la célula Treg tales como mAbs anti-CD25, daclizumab, basiliximab, o 2) toxinas dirigidas a ligando tales como denileucina diftitox (Ontak), una proteína de fusión de IL-2 humana y toxina de la difteria, o LMB-2, una fusión entre un scFv contra CD25 y exotoxina de *Pseudomonas*, y 3) anticuerpos dirigidos a receptores superficiales de células Treg tales como CTLA4, PD-1, OX40 y GITR, o 4) anticuerpos, moléculas pequeñas o proteínas de fusión dirigidas a otros receptores NK, como los identificados previamente.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con cualquiera de las opciones descritas más adelante para alterar la inducción y/o la función de Treg, que incluyen agonistas de TLR (receptores tipo peaje); agentes que interfieren con la ruta adenosinérgica, tal como inhibidores de ectonucleotidasa, o inhibidores del receptor de adenosina A2A; inhibidores de TGF-β, tal como fresolimumab, lerdelimumab, metelimumab, trabedersen, LY2157299, LY210976; bloqueo del reclutamiento de Tregs a tejidos tumorales, que incluyen inhibidores de receptor de quimiocina, tal como la ruta CCR4/CCL2/CCL22.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con cualquiera de las opciones descritas más adelante para inhibir el microentorno tumoral inmunosupresor, que incluyen inhibidores de citoquinas y enzimas que ejercen actividades inmunosupresoras, tales como inhibidores de IDO (indolamina-2,3-dioxigenasa); inhibidores de citoquinas anti-inflamatorias que promueven un microentorno inmunosupresor, tales como IL-10, IL-35, IL-4 e IL-13; Bevacizumab® que reduce Tregs y favorece la diferenciación de DCs.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con cualquiera de las opciones descritas más adelante para atacar MDSCs (células supresoras derivadas de mieolide), que incluye promover su diferenciación en células mieloides maduras que no presentan funciones supresoras por metabolitos de vitamina D3, o vitamina A, tales como ácido retinoico, ácido retinoico todo-trans (ATRA); inhibición de la actividad supresora de MDSCs mediante inhibidores de COX2, inhibidores de fosfodiesterasa 5 como sildenafil, inhibidores de ROS tales como nitroaspirina.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PVRIG se usan en combinación con anticuerpo inmunoestimuladores u otros agentes que potencian las respuestas inmunes anti-tumorales (Pardoll *J ExpMed*. 2012; 209(2): 201-209). Los

anticuerpos inmunoestimuladores promueven la inmunidad anti-tumoral modulando directamente las funciones inmunes, es decir, bloqueando otras dianas inhibidoras o potenciando proteínas inmunoestimuladoras. Según al menos algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas inmunes anti-PVRIG para inmunoterapia de cáncer se usan en combinación con anticuerpos antagonistas dirigidos contra puntos de control inmunes adicionales que incluyen mAbs 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 tal como IMP-321), anti-TIM-3, anti-BTLA, anti-B7-H4, anti-B7-H3, Anti-VISTA; anticuerpos agonistas dirigidos contra proteínas inmunoestimuladoras, que incluyen mAbs anti-CD40 tales como CP-870.893, lucatumumab, dacetuzumab; mAbs anti-CD137 tales como BMS-663513 urelumab, PF-05082566; mAbs anti-OX40, tales como anti-OX40; mAbs anti-GITR tales como TRX518; mAbs anti-CD27, tales como CDX-1127; y mAbs anti-ICOS.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con citoquinas. Una serie de citoquinas se encuentran en desarrollo preclínico o clínico como agentes que potencian las respuestas inmunes anti-tumorales para inmunoterapia de cáncer, que incluyen, entre otras: IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18 e IL-21, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFNα (interferón α), IFNβ, e IFNγ. Sin embargo, la eficacia terapéutica a menudo se ve impedida por efectos secundarios severos y unas malas propiedades farmacocinéticas. Por tanto, además de la administración sistémica de citoquinas, se puede emplear una variedad de estrategias para la administración de citoquinas terapéuticas y su localización en el sitio del tumor, a fin de mejorar su farmacocinética, así como su eficacia y/o citotoxicidad, que incluyen moléculas de fusión anticuerpo-citoquina (inmunocitoquinas), la conjugación química a polietilen glicol (PEGilación), la expresión transgénica de citoquinas en células tumorales enteras autólogas, la incorporación de genes de citoquina en vacunas de ADN, vectores virales recombinantes para administrar genes de citoquinas, etc. En el caso de las inmunocitoquinas, la fusión de citoquinas a anticuerpos específicos de tumor, o a fragmentos de anticuerpo, permite la administración dirigida y por tanto una mejor eficacia y farmacocinética, y menores efectos secundarios.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PVRIG se usan en combinación con vacunas de cáncer. Las vacunas terapéuticas contra el cáncer permiten una mejor imprimación de células T y una mejor presentación de antígenos, y pueden usarse como agentes terapéuticos para potenciar respuestas inmunes anti-tumorales (Mellman I. et al., 2011, *Nature*, 480: 22-29; Schlom J, 2012, *J Natl Cancer Inst*; 104: 599-613).

Varios tipos de vacunas terapéuticas contra el cáncer se encuentra en desarrollo preclínico o clínico. Éstas incluyen, por ejemplo:

1) Vacunas de célula tumoral entera, en las cuales se tratan células cancerosas extraídas mediante cirugía para potenciar su inmunogenicidad, y se inyectan al paciente para inducir respuestas inmunes contra antígenos en las células tumorales. La vacuna de célula tumoral puede ser autóloga, es decir, un tumor del propio paciente, o alogénica, que típicamente contiene dos o tres líneas celulares tumorales humanas establecidas y caracterizadas de un tipo de tumor dado, tal como las plataformas de vacunas GVAX.

2) Vacunas de antígeno tumoral, en las que se administra un antígeno tumoral (o una combinación de unos pocos antígenos tumorales), normalmente proteínas o péptidos, para activar el sistema inmunitario (posiblemente con un adyuvante y/o con moduladores o atractores inmunes de células dendríticas tales como GM-CSF). Los antígenos tumorales pueden ser específicos para un determinado tipo de cáncer, pero no se fabrican para un paciente específico.

3) Vacunas de antígeno tumoral basadas en vectores y vacunas de ADN, pueden usarse como una forma de proporcionar un suministro continuo de antígenos para estimular una respuesta inmune anti-tumoral. Los vectores que codifican antígenos tumorales son inyectados en el paciente (posiblemente con proinflamatorios u otros atractores tales como GM-CSF), son captados por las células *in vivo* para fabricar los antígenos específicos, que a continuación provocarían la respuesta inmune deseada. Se pueden usar vectores para administrar más de un antígeno tumoral a la vez, para aumentar la respuesta inmune. Adicionalmente, los vectores de virus, bacterias o levaduras recombinantes deberían activar sus propias respuestas inmunes, lo que también puede potenciar la respuesta inmune global.

4) Vacunas de virus oncolíticas, tales como OncoVez/T-VEC, que implica la inyección intratumoral de virus del herpes simple de replicación-condicional que infecta preferentemente células cancerosas. El virus, que también ha sido modificado para expresar GM-CSF, es capaz de replicarse dentro de una célula de cáncer produciendo su lisis, liberando nuevos virus y un conjunto de antígenos tumorales, y secretando GM-CSF en el proceso. De este modo, dichas vacunas víricas oncolíticas potencian la función de las DCs en el microentorno tumoral para estimular respuestas inmunes anti-tumorales.

5) Vacunas de células dendríticas (Palucka y Banchereau, 2102, *Nat. Rev. Cancer*, 12(4): 265-277): las células dendríticas (DCs) fagocitan células tumorales y presentan antígenos tumorales a células T específicas de tumor. En esta estrategia, se aíslan DCs del paciente con cáncer y se imprimen para presentar células T específicas de tumor. Para ello se pueden usar varios métodos: las DCs son cargadas con células o lisatos tumorales; las DCs son cargadas con proteínas de fusión o péptidos de antígenos tumorales; acoplamiento de antígenos tumorales a mAbs dirigidos a DC. Las DCs son tratadas en presencia de un factor estimulante (tal como GM-CSF), activadas y maduradas *ex vivo*, y a continuación re-infundidas de vuelta al paciente para provocar una respuesta inmune a otras células cancerosas. Las células dendríticas también pueden imprimarse *in vivo* mediante inyección de pacientes con células tumorales

enteras irradiadas modificadas para secretar citoquinas estimulantes (tal como GM-CSF). Se pueden llevar a cabo estrategias similares con monocitos. Sipuleucel-T (Provenge), una vacuna terapéutica contra el cáncer que ha sido aprobada para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado, es un ejemplo de vacuna de células dendríticas.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con terapia de células T adoptivas o transferencia de células adoptivas (ACT), que implica la identificación y expansión *ex vivo* de células T específicas de tumor naturales autólogas, que a continuación son transferidas de vuelta adoptivamente al paciente de cáncer (Restifo et al, 2013, *Cancer Immunol. Immunother*.62(4): 727-36 (2013) Epub Dic. 4 2012). Las células que infundidas de vuelta a un paciente tras expansión *ex vivo* pueden apuntar al tumor y mediar en su destrucción. Antes de esta transferencia adoptiva, los hospedantes pueden ser inmunoagotados mediante radiación y/o quimioterapia. La combinación de linfoagotamiento, transferencia de células adoptivas, y un factor de crecimiento de célula T (tal como IL-2), puede conducir a una erradicación prolongada del tumor en pacientes tumorales. Una estrategia más novedosa implica la modificación genética *ex vivo* de células T de sangre periférica normales para conferir especificidad por los antígenos asociados al tumor. Por ejemplo, se pueden insertar clones de TCRs o de células T con respuestas anti-tumorales particularmente buenas en vectores de expresión víricos y usarse para infectar células T autólogas de paciente en tratamiento. Otra opción es el uso de receptores de antígeno quiméricos (CARs) que son esencialmente unas moléculas quiméricas de inmunoglobulina-TCR, también conocidas como T-cuerpos. Los CARs tienen especificidades de tipo anticuerpo y reconocen estructuras no restringidas de MHC sobre la superficie de las células diana (el módulo de unión a diana extracelular), ancladas a los dominios intracelulares TCR capaces de activar células T (Restifo et al *Cancer Immunol. Immunother*. 62(4): 727-36 (2013) Epub Dic. 4 2012; y Shi et al, *Nature* 493: 111-115, 2013.

Los anticuerpos de PVRIG y uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente. La composición puede estar ligada a un agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse de forma separada del agente. En este último caso (administración separada), la composición se puede administrar antes, después o concurrentemente con el agente, o puede co-administrarse con otras terapias conocidas, p.ej., una terapia anti-cáncer, p.ej., radiación.

La co-administración de las moléculas inmunes anti-PVRIG humanizadas, según al menos algunas realizaciones de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anti-cáncer que operan a través de mecanismos diferentes que dan lugar a un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha co-administración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las haría no reactivas con el anticuerpo. En otras realizaciones, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que modula, p.ej., potencia o inhibe, la expresión o la actividad de Fcy o de receptores de Fcy, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina.

También pueden usarse como agentes terapéuticos células efectoras específicas de diana, p.ej., células efectoras ligadas a composiciones (p.ej., anticuerpos humanos, moléculas multi-específicas y bi-específicas) según al menos algunas realizaciones de la presente invención. Las células efectoras para ataque pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células portadoras de receptor de IgG o IgA. Si se desea, se pueden obtener células efectoras del sujeto en tratamiento. Las células efectoras específicas de diana pueden administrarse como una suspensión de células en una disolución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de 10^{-8} a 10^{-9} pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, p.ej., una célula tumoral que expresa proteínas PVRIG, y para efectuar la muerte celular, p.ej., mediante fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de diana se puede llevar a cabo en conjunción con otras técnicas para la eliminación de células diana. Por ejemplo, se puede usar terapia anti-tumoral con las composiciones (p.ej., anticuerpos humanos, moléculas multi-específicas y bi-específicas) según al menos algunas realizaciones de la presente invención y/o células efectoras armadas con dichas composiciones en conjunción con quimioterapia. Adicionalmente, se puede usar inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de células tumorales. Por ejemplo, se pueden usar moléculas inmunes anti-PVRIG ligadas a anti-Fc-γRI o anti-CD3 en conjunción con agentes de unión específicos de receptor de IgG o IgA.

También se pueden usar moléculas bi-específicas y multi-específicas según al menos algunas realizaciones de la presente invención para modular FcγR o los niveles de FcγR en células efectoras, tal como tapando y eliminando los receptores de la superficie celular. También se pueden usar mezclas de receptores anti-Fc para este propósito.

Las composiciones terapéuticas (p.ej., anticuerpos humanos, moléculas multi-específicas y bi-específicas de estructuras alternativas e inmunoconjugados) según al menos algunas realizaciones de la presente invención que tienen sitios de unión de complemento, tal como porciones de IgG1, -2 o -3, o IgM, que se unen a complemento, también pueden usarse en presencia de complemento. En una realización, el tratamiento ex vivo de una población de células que comprenden células diana con un agente de unión según al menos algunas realizaciones de la presente invención y células efectoras apropiadas puede suplementarse mediante la adición de complemento o complemento que contiene suero. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión según al menos algunas realizaciones de la presente invención puede mejorarse mediante la unión de proteína de complemento. En otra realización, las células diana recubiertas con las composiciones (p.ej., anticuerpos humanos, moléculas multi-

específicas y bi-específicas) según al menos algunas realizaciones de la presente invención, también pueden ser lisadas por complemento. En otra realización adicional, las composiciones según al menos algunas realizaciones de la presente invención no activan complemento.

Las composiciones terapéuticas (p.ej., anticuerpos humanos, moléculas multi-específicas y bi-específicas de estructuras alternativas e inmunoconjugados) según al menos algunas realizaciones de la presente invención también pueden ser administradas junto a complemento. Por tanto, según al menos algunas realizaciones de la presente invención existen composiciones, que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multi-específicas o bi-específicas y suero o complemento. Dichas composiciones son ventajosas en que el complemento está localizado en estrecha proximidad respecto a los anticuerpos humanos, o las moléculas multi-específicas o bi-específicas. Alternativamente, los anticuerpos humanos, moléculas multi-específicas o bi-específicas de al menos algunas realizaciones de la presente invención y el complemento o suero pueden administrarse por separado.

Las moléculas inmunes anti-PVRIG, según al menos algunas realizaciones de la presente invención, también pueden usarse como anticuerpos neutralizantes. Un anticuerpo neutralizante (Nabs), es un anticuerpo que es capaz de unirse y neutralizar o inhibir un antígeno específico, inhibiendo con ello su efecto biológico. Los NAbs eliminarán parcial o completamente la acción biológica de un agente a través del bloqueo de una molécula superficial importante necesaria para su actividad, o interfiriendo en la unión del agente con su receptor en una célula diana.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se pueden usar agentes terapéuticos para prevenir la inhibición patológica de la actividad de células T, tal como aquella dirigida contra células cancerosas.

Por tanto, según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para tratar cáncer como el mencionado en la presente memoria, y/o para promover la estimulación inmune a través de la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de uno cualquiera de los agentes terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los agentes terapéuticos y que además comprenden un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según al menos algunas realizaciones, las células inmunes, preferiblemente células T, se pueden poner en contacto *in vivo* o *ex vivo* con los agentes terapéuticos para modular las respuestas inmunes. Las células T puestas en contacto con los agentes terapéuticos pueden ser cualquier célula que expresa el receptor de célula T, que incluye receptores de células T α/β y γ/δ. Las células T incluyen todas las células que expresan CD3, que incluyen subconjuntos de células T que también expresan CD4 y CDS. Las células T incluyen tanto células vírgenes (naive) como de memoria y células efectoras tales como linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL). Las células T también incluyen células tales como Th1, Tc1, Th2, Tc2, Th3, Th9, Th17, Th22, Treg, células colaboradoras foliculares (T_{FH}) y células Tr1. Las células T también incluyen células NKT iNKT, NKT α/β y NKT γ/δ, y clases únicas similares del linaje de células T.

Los anticuerpos de bloqueo de PVRIG pueden usarse en combinación con anticuerpos bi-específicos que dirigen células efectoras que expresan receptor de Fcα o Fcγ a las células tumorales (véase, p.ej., Patentes de EE.UU. nº 5.922.845 y 5.837.243). Los anticuerpos bi-específicos pueden usarse para atacar dos antígenos separados. Por ejemplo, se han usado anticuerpos bi-específicos anti-receptor Fc/anti-antígeno tumoral (p.ej., Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Esta dirección puede activar de una forma más efectiva las respuestas específicas de tumor. El brazo de células T de dichas respuestas aumentaría por el uso del bloqueo de PVRIG. Alternativamente, el antígeno se pude administrar directamente a DCs mediante el uso de anticuerpos bi-específicos que se unen a antígeno de tumor y a un marcador de superficie celular específico de célula dendrítica.

Los tumores evaden la vigilancia inmune del hospedante a través de una gran variedad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden solventarse mediante la inactivación de proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Éstas incluyen entre otras TGF-β (Kehrl, J. et al. (1986) *J Exp. Med*. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), y ligando Fas (Hahne, M. et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Los anticuerpos de cada una de estas entidades pueden usarse en combinación con anti-PVRIG para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunes del hospedante.

Pueden usarse en combinación con anti-PVRIG otros anticuerpos que pueden usarse para activar la capacidad de respuesta inmune. Éstos incluyen moléculas de la superficie de células dendríticas que activan la función DC y la presentación de antígenos. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir de forma efectiva para la actividad colaboradora de célula T (Ridge, J. et al. (1998) Nature 393: 474-478) puede usarse en conjunción con anticuerpos de PVRIG (Ito, N. et al. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). La activación de anticuerpos de moléculas coestimuladoras de células T tales como OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), e ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) así como anticuerpos que bloquean la actividad de moléculas coestimuladoras negativas tales como CTLA-4 (p.ej., Patente de EE.UU. nº 5.811.097, implimumab) o BTLA (Watanabe, N. et al. (2003) *Nat Immunol* 4: 670-9), B7-H4 (Sica, G Let al. (2003) *Immunity* 18: 849-61) PD-1, también pueden proporcionar niveles incrementados de activación de células T. Actualmente se está usando el trasplante de médula ósea para tratar una variedad de tumores de origen hematopoyético. Aunque la enfermedad de injerto contra hospedante es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse a partir de respuestas de injerto contra tumor. El bloqueo de PVRIG pueden usarse para aumentar la eficacia de las células T específicas de tumo injertadas en el donante.

También existen varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de células T específicas de antígeno y la transferencia adoptiva de dichas células a receptores para activar células T específicas de antígeno contra el tumor (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Estos métodos también pueden usarse para activar respuestas de células T frente a agentes infecciosos tales como CMV. Se puede esperar que la activación *ex vivo* en presencia de moléculas inmunes anti-PVRIG aumente la frecuencia y la actividad de las células T transferidas adoptivamente.

Opcionalmente, los anticuerpos de PVRIG se pueden combinar con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas, péptidos y moléculas de carbohidratos recombinantes), células, y células transfectadas con genes que codifican citoquinas estimuladoras inmunes (He et al (2004) *J Immunol*. 173: 4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que pueden usarse incluyen péptidos de MUC1 para el tratamiento de cáncer de colon, péptidos de MUC-1/CEA/TRICOM para el tratamiento del cáncer de ovario, o células tumorales para expresar la citoquina GM-CSF (discutido detalladamente más adelante).

En humanos, se ha demostrado que algunos tumores son inmunogénicos, tal como RCC. Se anticipa que elevando el umbral de activación de células T mediante el bloqueo de PVRIG, se puede esperar la activación de respuestas tumorales en el hospedante.

El bloqueo de PVRIG probablemente es más efectivo cuando se combina con un protocolo de vacunación. Se han contemplado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, *ASCO Educational Book Spring*: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; véase también Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 en DeVita, V. et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principies and Practice of Oncology*. *Fifth Edition*). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que dichas vacunas celulares son más efectivas cuando las células tumorales son transducidas para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que el GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación tumoral (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y de los patrones de expresión génica a gran escala en varios tumores ha conducido a la definición de los conocidos como antígenos específicos de tumor (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, dichos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula a partir de los cuáles surgió el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocito gp100, antígenos MAGE, y Trp-2. Más importante, muchos de estos antígenos pueden demostrar ser las dianas de células T específicas de tumor observadas en el hospedante. Se puede usar el bloqueo de PVRIG en conjunción con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor a fin de generar una respuesta inmune frente a estas proteínas. Dichas proteínas normalmente son vistas por el sistema inmunitario como auto-antígenos y por lo tanto son tolerantes a las mismas. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que es requerida para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85% de los cánceres humanos y solo en un número limitado de tejidos somáticos (Kim, N et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Dichos tejidos somáticos pueden protegerse frente al ataque inmune por diversos medios). Los antígenos tumorales también pueden ser “neo-antígenos” expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteínica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-ab1 en el cromosoma Philadelphia), o idiotipo de tumores de célula B.

Otras vacunas tumorales pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como el virus del papiloma humano (HPV), los virus de la hepatitis (HBV y HCV) y el virus de sarcoma de herpes de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico de tumor que puede usarse en conjunción con el bloqueo de PVRIG son las proteínas de choque térmico (HSP) purificadas, aisladas del propio tejido del tumor. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales, y dichas HSPs son altamente eficientes en la administración a células presentadoras de antígeno para activar una inmunidad tumoral (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura, Y. et al. (1997) *Science* 278: 117-120).

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígenos potentes que pueden usarse para imprimar respuestas específicas de antígeno. Las DCs pueden producirse *ex vivo* y cargarse en con diversos antígenos de proteína y péptido, así como con extractos de células tumorales (Nestle, F. et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Asimismo, las DCs también pueden transducirse por medios genéticos para expresar dichos antígenos tumorales. Las DCs también han sido fusionadas directamente a células tumorales con el fin de inmunización (Kugler, A. et al. (2000) *Nature Medicine* 6: 332-336). Como método de vacunación, la inmunización de DC puede combinarse de forma efectiva con el bloqueo de PVRIG para activar respuestas anti-tumorales más potentes.

Uso de los agentes terapéuticos según al menos algunas realizaciones de la invención como adyuvante para vacunación de cáncer:

La inmunización contra antígenos asociados a tumor (TAAs) es una estrategia prometedora para la terapia y prevención de cáncer, pero afronta varios retos y limitaciones, tales como los mecanismos de tolerancia asociados a auto-antígenos expresados por las células tumorales. Moléculas coestimuladoras tales como B7.1 (CD80) y B7.2

(CD86) han mejorado la eficacia de las vacunas de base génica y de base celular en modelos animales y se encuentran bajo investigación como adyuvante en ensayos clínicos. Esta actividad de adyuvante puede lograrse potenciando la señal coestimuladora o bloqueando la señal inhibidora que se transmite por coestimuladores negativos expresados por células tumorales (Neighbors et al., 2008 *J Immunother.*; 31 (7): 644-55).

Según al menos algunas realizaciones de la invención, uno cualquiera de los anticuerpos policlonales o monoclonales y/o de los fragmentos de unión a antígeno y/o de los conjugados que los contienen, y/o de las estructuras alternativas, específicos para una cualquiera de las proteínas PVRIG, puede usarse como adyuvante para vacunación de cáncer. Según al menos algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para mejorar la inmunización contra TAAs, que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos policlonales o monoclonales y/o de los fragmentos de unión a antígeno y/o de los conjugados que los contienen, y/o de las estructuras alternativas, específicos para una cualquiera de las proteínas PVRIG.

En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de anticuerpos de PVRIG para llevar a cabo uno o más acciones de las siguientes en un sujeto que lo necesite: (a) regular al alza las citoquinas pro-inflamatorias; (b) aumentar la proliferación y/o la expansión de células T; (c) aumentar la producción de interferón-γ o de TNF-α por las células T; (d) aumentar la secreción de IL-2; (e) estimular respuestas de anticuerpos; (f) inhibir el crecimiento de células cancerosas; (g) promover la inmunidad de células T específica de antígeno; (h) promover la activación de células T $CD4^+$ y/o $CD8^+$; (i) aliviar la supresión de células T; (j) promover la actividad de células NK; (k) promover la apoptosis o lisis de células cancerosas; y/o (l) el efecto citotóxico o citostático en células cancerosas.

En otras realizaciones, la invención proporciona el uso de un anticuerpo inmunoestimulador, un fragmento de unión a antígeno o conjugado del mismo según al menos algunas realizaciones de la invención (opcionalmente en una composición farmacéutica) para antagonizar al menos un efecto inhibidor inmune de la PVRIG.

Dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o conjugado del mismo, opcional y preferiblemente media en al menos uno de los siguientes efectos:

(i) aumento de la respuesta inmune, (ii) aumento de la activación de células T αβ y/o γδ, (iii) aumento de la actividad de células T citotóxicas, (iv) aumento de la actividad de células NK y/o NKT, (v) alivio de la supresión de células T αβ y/o γδ, (vi) aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, (vii) aumento de la secreción de IL-2; (viii) aumento de la producción de interferón-γ, (ix) aumento de la respuesta de Th1, (x) reducción de la respuesta de Th2, (xi) reducción o eliminación del número de células y/o de la actividad de al menos una célula T reguladora (Tregs).

3. Determinación del tratamiento

Generalmente los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se administran a pacientes con cáncer, y se determina la eficacia, de varios modos, como se describe en la presente memoria. De esta manera, aunque se pueden llevar a cabo ensayos estándar de eficacia, tal como la carga de cáncer, el tamaño del tumor, la evaluación de la presencia o la extensión de metástasis, etc., los tratamientos inmuno-oncológicos pueden determinarse también en base a las evaluaciones del estatus inmune. Esto puede hacer de varias formas, que incluyen ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se puede realizar la evaluación de los cambios en el estatus inmune (p.ej., la presencia de células T ICOS+ CD4+ después de un tratamiento ipi) junto con medidas “a la antigua usanza” tales como la carga tumoral, el tamaño, y el grado de invasión, la implicación de LN, metástasis, etc. Por tanto, se puede evaluar cualquiera de los ítems siguientes, o todos ellos: los efectos inhibidores de PVRIG sobre la activación o la proliferación de células T $CD4^+$, la activación o la proliferación de células T $CD8^+$ (CTL), la actividad citotóxica mediada por células T $CD8^+$ y/o el agotamiento de células mediado por CTL, la actividad de células NK y el agotamiento de células mediado por NK, los efectos potenciadores de la PVRIG sobre la diferenciación y proliferación de células Treg y la inmunosupresión o inmunotolerancia mediada por células supresoras derivadas de mieloide o Treg (MDSC), y/o los efectos de la PVRIG sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de células inmunes, p.ej., la producción de IL-2, IFN-γ o TNF-α por células T u otras células inmunes.

En algunos aspectos de la descripción, la determinación del tratamiento se realiza evaluando la proliferación de células inmunes, usando por ejemplo, el método de dilución CFSE, la tinción Ki67 intracelular de células efectoras inmunes, y el método de incorporación de 3H-timidina.

En algunos aspectos de la descripción, la determinación se realiza evaluando el aumento de la expresión génica o el aumento de los niveles de proteína de marcadores asociados a la activación, que incluyen uno o más de: CD25, CD69, CD137, ICOS, PD1, GITR, OX40, y la desgranulación celular medida mediante expresión superficial de CD107A.

En general, los ensayos de expresión génica se llevan a cabo como se conoce 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 (Suppl. 1): 29-46, Campo et al., Nod. Pathol. 2013 Jan; 26 suppl. 1: S97-S110, cuyas técnicas de medición de la expresión génica se incorporan específicamente a la presente memoria a modo de referencia.

En general, las medidas de expresión proteínica también se realizan de forma similar como es conocido 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 de artículo 361590, 8 páginas, Becerk et al., Mutat. Res 2011 Junio 17: 722(2): 171-182, cuyas técnicas de medida se incorporan expresamente a la presente memoria a modo de referencia.

En algunos aspectos de la descripción, la determinación del tratamiento se realiza determinando la actividad citotóxica vía detección de la viabilidad de células diana estimando numerosos parámetros celulares tales como la actividad enzimática (que incluye la actividad de proteasa), la permeabilidad de la membrana celular, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de co-enzima, y la actividad de captación de nucleótidos. Los ejemplos específicos de estos ensayos incluyen, aunque sin limitación, tinción de Azul de tripano o PI, el método de liberación de ^{51}Cr o ^{35}S, la actividad de LDH, los ensayos MTT y/o WST, el ensayo de calceína-AM, el ensayo basado en luminiscencia, y otros.

En algunos aspectos de la descripción, la determinación del ensayo se realiza determinando la actividad de células T medida mediante la producción de citoquinas, medida tanto intracelularmente o en sobrenadante de cultivo usando citoquinas que incluyen, aunque sin limitación, IFNγ, TNFα, GM-CSF, IL2, IL6, IL4, IL5, IL10, IL13 usando técnicas bien conocidas.

Por consiguiente, la determinación del tratamiento se puede realizar usando ensayos que evalúan uno o más de los siguiente ítems: (i) aumento de la respuesta inmune, (ii) aumento de la activación de células T αβ y/o γδ, (iii) aumento de la actividad de células T citotóxicas, (iv) aumento de la actividad de células NK y/o NKT, (v) alivio de la supresión de células T αβ y/o γδ, (vi) aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, (vii) aumento de la secreción de IL-2; (viii) aumento de la producción de interferón-γ, (ix) aumento de la respuesta de Th1, (x) reducción de la respuesta de Th2, (xi) reducción o eliminación del número de células y/o de la actividad de al menos una célula T reguladora (Tregs.

Ensayos para medir la eficacia

En algunos aspectos de la descripción, la activación de células T se determina usando un ensayo de Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR) tal como se describe en el Ejemplo 23. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la respuesta inmune medida para un ejemplo por fosforilación o des-fosforilación de diferentes factores, o midiendo otras modificaciones post-traduccionales. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide aumentos o reducciones de la activación de células T αβ y/o γδ medida por ejemplo a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la actividad de células T citotóxicas medida por ejemplo a través de la muerte directa de células diana como por ejemplo células cancerosas, o a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la actividad de células NK y/o NKT medida por ejemplo a través de la muerte directa de células diana como por ejemplo células cancerosas o a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD107a, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la supresión de células T αβ y/o γδ, medida por ejemplo a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias medidas por ejemplo mediante ELISA o Luminex o métodos basados en perlitas Multiplex o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la secreción de IL-2 medidas por ejemplo mediante ELISA o Luminex o métodos basados en perlitas Multiplex o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la producción de interferón-γ medidas por ejemplo mediante ELISA o Luminex o métodos basados en perlitas Multiplex o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la respuesta de Th1 medida por ejemplo a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la respuesta de Th2 medida por ejemplo a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en el número y/o la actividad de al menos una de las células T reguladoras (Tregs), medida por ejemplo mediante citometría de flujo o mediante IHC. Una reducción en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen reducciones apropiadas, que son iguales que para los aumentos.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en el número de células de macrófagos M2, medido por ejemplo mediante citometría de flujo o mediante IHC. Una reducción en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen reducciones apropiadas, que son iguales que para los aumentos.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la actividad pro-tumorigénica de macrófagos M2, medida por ejemplo a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación. Una reducción en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen reducciones apropiadas, que son iguales que para los aumentos.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de neutrófilos N2, medido por ejemplo mediante citometría de flujo o mediante IHC. Una reducción en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen reducciones apropiadas, que son iguales que para los aumentos.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la actividad pro-tumorigénica de neutrófilos N2, medida por ejemplo a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación. Una reducción en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen reducciones apropiadas, que son iguales que para los aumentos.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la inhibición de la activación de células T, medida por ejemplo a través de la secreción o proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones en la inhibición de la activación de CTL, medida por ejemplo a través de la muerte directa de células diana como por ejemplo células cancerosas o a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de los cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones del agotamiento de células T αβ y/o γδ medido por ejemplo a través de los cambios en la expresión de marcadores de activación. Una reducción en la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen reducciones apropiadas, que son iguales que para los aumentos.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la respuesta de células T αβ y/o γδ medida por ejemplo a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de los cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la estimulación de respuestas de memoria específicas de antígeno medida por ejemplo a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD45RA, CCR7, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la apoptosis o lisis de células cancerosas medida por ejemplo a través de ensayos de citotoxicidad, como por ejemplo MTT,

liberación de Cr, Calcina AM, o mediante ensayos basados en citometría de flujo como por ejemplo dilución de CFSE o tinción de yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la estimulación del efecto citotóxico o citostático en células cancerosas medida por ejemplo a través de MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o mediante ensayos basados en citometría de flujo como por ejemplo dilución de CFSE o tinción de yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la muerte directa de células cancerosas medida por ejemplo a través de ensayos de citotoxicidad, como por ejemplo MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o mediante ensayos basados en citometría de flujo como por ejemplo dilución de CFSE o tinción de yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la actividad de Th17 medida por ejemplo a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

En un aspecto de la descripción, el ensayo de ruta de señalización mide los aumentos o las reducciones de la inducción de citotoxicidad dependiente de complemento y/o la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, medida por ejemplo a través de ensayos de citotoxicidad, como por ejemplo MTT, liberación de Cr, Calcina AM, o mediante ensayos basados en citometría de flujo como por ejemplo dilución de CFSE o tinción de yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. A continuación se describen aumentos apropiados en la actividad.

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

En un aspecto de la descripción, la activación de células NK se mide por ejemplo a través de la muerte directa de células diana como por ejemplo células cancerosas o a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación como por ejemplo CD107a, etc. Para las células NK, un aumento de la proliferación, la citotoxicidad (capacidad para matar células diana y aumento de la expresión de CD107a, granzima y perforina), la producción de citoquinas (p.ej., IFNγ y TNF), y la expresión de receptor de superficie celular (p.ej., CD25) sería consistente con un aumento de la muerte de células cancerosas.

En un aspecto de la descripción, la activación de células T γδ se mide por ejemplo a través de la secreción o la proliferación de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación.

En un aspecto de la descripción, la activación de células Th1 se mide por ejemplo a través de la secreción de citoquinas o a través de cambios en la expresión de marcadores de activación.

Los aumentos apropiados para la actividad o respuesta (o las reducciones, según sea apropiado como se ha descrito anteriormente), son aumentos del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98 a 99% sobre la señal de una muestra de referencia o de muestras de control, por ejemplo muestras de ensayo que no contienen un anticuerpo anti-PVRIG de la invención. De forma similar, los aumentos de al menos una, dos, tres, cuatro o cinco veces en comparación con la referencia o las muestras de control se considera que muestran eficacia.

Ejemplos

Se hace referencia a USSN XX, presentada el 19 de febrero de 2016, titulada "PVRIG POLYPEPTIDES AND METHODS OF TREATMENT", que reivindica prioridad a USSN por USSN 62/118.235, presentada el 19 de febrero de 2015, y por USSN 62/141.168, presentada el 31 de marzo de 2015, todas las cuales se incorporan expresamente a la presente memoria en su totalidad a modo de referencia.

Ejemplo 1: Análisis de expresión de proteínas PVRIG

Ejemplo 1A:

Se analizó el conjunto de datos GDS3113 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS3113) para identificar genes con un patrón específico de órgano linfoide. Se identificó la PVRIG como específica de linfocitos

debido a la elevada expresión en órganos linfoides primarios y secundarios, que incluyen sangre periférica, médula ósea, bazo, nodos linfáticos, amígdala y timo (Figura 2). Otros tipos de tejido fueron negativos y mostraron expresión de niveles de ruido de fondo. Con el objetivo de investigar qué tipos celulares específicos de la población total de células inmunes expresan PVRIG, se analizaron conjuntos de datos adicionales del "Gene Expression Omnibus" (www.ncbi.nlm.nih.gov/GEO), como se describe en la sección de "metodología" de la presente memoria. El análisis se llevó a cabo sobre poblaciones de células inmunes derivadas de sangre periférica y médula ósea. La PVRIG se expresó en linfocitos tanto de linaje de células B como de linaje de células T, que incluyen células T CD8 vírgenes, efectoras y de memoria (Figura 3). Adicionalmente, se expresó PVRIG en células NK y presentó la mayor expresión en la población de iNKT (Figura 4). La población iNKT de linfocitos actúan como activadores potentes de la inmunidad antitumoral cuando se estimulan con un agonista sintético en modelos experimentales. Sin embargo, en algunas condiciones, las células iNKT pueden actuar como supresores y reguladores de la inmunidad antitumoral (Clin Dev Immunol. 2012; 2012: 720803). Adicionalmente, en ensayos clínicos tempranos de inmunoterapia basada en células iNKT se ha demostrado que el tratamiento de infusión de células presentadoras de antígeno pulsadas con ligando, y/o células iNKT activadas *in vitro*, son seguros y bien tolerados en cáncer de pulmón y en cáncer de cabeza y cuello (Clin Immunol. 2011 agosto; 140(2): 167-76).

Una cuestión clave en relación a la expresión de PVRIG era si los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) retienen la expresión de PVRIG en el microentorno tumoral. El análisis de los datos de expresión de TILs de linfoma folicular, cáncer de mama y cáncer de colon mostró una clara expresión de PVRIG en los TILs infiltrantes en el tumor. En el ejemplo del cáncer de colon, la especificidad a las células infiltrantes inmunes fue observada solo cuando la expresión se da en la población positiva de CD45 (marcador específico de leucocitos), y no se da expresión en la población positiva de EPCAM (marcador específico epitelial) o la población negativa de CD45 y negativa de EPCAM (población de células estromales). Aunque el CD45 no es un marcador específico de linfocitos, la otra descripción de expresión infiere que se expresa en la población de linfocitos (Figura 5 A cáncer de colon, Figura 5B cáncer de mama y Figura 5C linfoma folicular).

Los datos de expresión de ARNm mostrados en la presente memoria indican que la PVRIG se expresa en linfocitos y en linfocitos infiltrantes tumorales (TILs). Estos resultados junto con la actividad inhibidora de PVRIG proponen un papel inhibidor de la molécula en células T, lo que sugiere que los anticuerpos inhibidores de PVRIG elevan el papel supresor de la PVRIG sobre los TILs y por tanto permiten a los TILs inducir una respuesta inmune contra el cáncer. Como el mecanismo de acción propuesto está dirigido a los TILs que se infiltran en el tumor, más que al efecto directo sobre las células tumorales, cualquier cáncer con infiltración inmune es candidato para el tratamiento usando anticuerpos inhibidores de PVRIG.

Metodología: Los datos en bruto son descargados del sitio web de GEO en formato SOFT. En los casos en los que los datos en bruto están en formato MAS5, los datos son tratados sin manipulación. Si los datos están en Log MAS5, entonces son convertidos a datos lineales. Si los datos están en ficheros CEL de formato RMA (datos en bruto) se descargan y re-analizan usando MAS5. Si no están disponibles los ficheros CEL, se usa el formato RMA.

A continuación los datos son normalizados por multiplicativo según el percentil 95º de datos Affy. Conjuntos de datos analizados: GSE49910, GSE47855, GSE39397, GSE36765, GSE27928.

Ejemplo 1B

Se generó una referencia de transcriptoma en base a modelos génicos UCSC conocidos (http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/database/knownGene.txt.gz). Todas las lecturas de secuenciamiento de ARN fueron alineadas primero con las secuencias de transcriptoma. Este alineamiento permitió un mapeado no único porque las isoformas comparten muchos exones. Entonces se asignó a cada lectura unas coordenadas genómicas y unas uniones de exón en base al emparejamiento de transcriptoma. El resto de lecturas no mapeadas fueron alineadas directamente con el genoma considerando una o más uniones de exón. Finalmente, el recuento de lecturas se normalizó como se describe en Bo et al. (Bioinformatics 2010, 26 (4): 493-500) y se convirtió en valores de expresión génica como se describe en Trapnell et al (Nat Biotechnol. 2010 May;28(5): 511-5).

Tal como se muestra en la Figura 6, en base a los datos de Expresión de Tejido de Genotipo (GTEx) (http://www.nature.com/ng/joumal/v45/n6/full/ng.2653.html; http://www.gtexportal.org/home/), la PVRIG se expresa principalmente en células sanguíneas y en menor medida en diversos tejidos normales. Se observaron los mismos resultados en tejidos cancerosos de "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) (http://cancergenome.nih.gov/) en el que se observa una expresión elevada en cánceres sanguíneos como los linfomas de células B y AML (Figura 7). Se generó una firma de expresión génica para una variedad de cánceres y tejidos normales usando datos GTEx y TCGA identificando genes con un patrón de expresión altamente correlacionado con PVRIG.

El análisis de correlación se llevó a cabo por tipo de tumor y solo se consideraron las correlaciones en las que ambos genes estaban expresados por encima de 0 RPMK con al menos 50 muestras del mismo tipo de tumor. Estas firmas de expresión génica fueron evaluadas para determinar el enriquecimiento de proteínas de interacción, rutas y genes de enfermedad. Los valores-p de enriquecimiento se calcularon para cada tipo de tumor y se usó el –log(valor-p) medio para clasificar las puntuaciones de conjuntos genéticos. Se observó una firma clara de linfocitos y células T en una variedad de cánceres, tal como muestra la Figura 8. Por ejemplo, el gen de puntuación máxima en la interacción de

proteína fue IL2, lo que significa que los genes que se sabe que interaccionan con IL2 se correlacionan más con PVRIG de lo esperado en la mayoría de los cánceres. Un análisis adicional mostró que la expresión de PVRIG en tejidos de cáncer es mayor de lo normal. Mientras que en la Figura 5 el nivel de expresión medio de PVRIG está por debajo de 1 en la mayoría de los tejidos sólidos normales, en la Figura 6 es claramente superior a 1 en muchos cánceres. A modo de ejemplo, cuando se comparan lado a lado en la Figura 7, la PVRIG de melanoma se expresó de forma más elevada que en piel normal (Figura 9). Además, se realizó la caracterización de la fuente de la sobre-expresión en el cáncer. La PVRIG está expresada de forma elevada en células T y se correlaciona de forma elevada con marcadores de células T en el cáncer. En la Figura 10, se muestra a modo de ejemplo la correlación de PVRIG con CD3, CD4 y CD8 en tres tipos de cáncer, a saber, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon y melanoma. Adicionalmente, la PVRIG está altamente correlacionada con PD1, una diana validada para inmunoterapia en cáncer, que se sabe que es expresada en células T (Figura 10).

Estas firmas de expresión génica fueron evaluadas para determinar el enriquecimiento de proteínas, rutas y genes de enfermedad. Se observó una firma clara de linfocitos y células T en una variedad de cánceres, tal como se muestra en la Figura 8. Se analizó adicionalmente la correlación de PVRIG y PD1, y mostró una alta correlación entre su expresión en varios tumores que incluyen mama, pulmón, páncreas y riñón (Tabla 2). Tanto PD-1 como PVRIG son expresados de forma elevada en células T activadas. La PVRIG mostró una elevada correlación con marcadores de células T en cáncer, a saber, CD8A, CD4 y CD3G (Figura 13). Considerados en conjunto, estos datos demuestran que la expresión en cáncer de la PVRIG está asociada a linfocitos infiltrantes tumorales.

Métodos: correlación de genes: los valores FPKM fueron transformados a log2 (FPKM+0.1). Se omitieron las muestras con un valor que cumple log2 (FPKM+0.1) < log2(0.1) para al menos uno de los genes. Se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson (PCC) y los Estimadores de Mínimos Cuadrados correspondientes a la línea de regresión para las 2 listas (una lista por gen). Los PCCs con un valor inferior a 0.5 fueron omitidos, así como los PCCs que no consiguieron mostrar un valor significativo cuando se evaluó la correlación lineal entre los niveles de expresión de los 2 genes.

Análisis de enriquecimiento génico: la ruta, la interacción y los datos de enfermedad se obtuvieron de GeneGo Metacore (https://portal.genego.com), Reactome (http://www.reactome.org) y KEGG Pathways (http://www.genome.jp/kegg). Para identificar las rutas y los procesos enriquecidos dentro de una lista génica dada, se implementó un análisis de enriquecimiento basado en hiper-geometría. Se calculó el valor-p hiper-geométrico usando el programa R (http://www.R-project.org) con el siguiente comando: phyper(x - 1, m, n-m, k y lower.tail = FALSE), donde x es el número de genes de la lista de genes que son miembros de la ruta, m es el número de genes en la ruta, n es el número total de genes únicos en todas las rutas, y k es el número de genes de la lista que estaban presentes en al menos una ruta. El valor-p resultante es indicativo de la probabilidad de enriquecimiento para una ruta específica aleatoria dado el tamaño de la lista de genes. Se aplicó el mismo procedimiento analítico para las interacciones génicas, donde todos los genes que interaccionan con un gen dado fueron tratados como una ruta; o los genes asociados con una enfermedad donde todos los genes asociados fueron tratados como una ruta. Véase la Figura 64.

La expresión de PVRIG se asoció a células T agotadas en cáncer. Se eligieron muestras de cáncer de TCGA que presentan una elevada expresión (4ª cuartil) de los siguientes 4 marcadores: CD8, PD-1, TIM-3 y TIGIT. A continuación las muestras de cáncer se dividieron en nivel alto, sin cambios y nivel bajo de la expresión combinada de los 4 marcadores. No se detectó PVRIG en ninguno de los marcadores de baja expresión (células T poco o nada agotadas). La gran mayoría de los tumores asociados a niveles elevados de células T agotadas expresaron niveles elevados de PVRIG (Figura 22).

Ejemplo 1C:

Se evaluó la expresión de ARN y proteína de PVRIG humana y de primates no humanos en líneas celulares y en leucocitos primarios.

Protocolos

Análisis FACS de células modificadas sobre-expresadoras: se usaron las siguientes líneas celulares para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-PVRIG humana: células HEK progenitoras y células HEK que sobre-expresan hPVRIG. Estas células se cultivaron en DMEM (Gibco) + 10% de suero fetal de ternero (Gibco) + glutamax (Gibco). Para las células HEK que sobre-expresan hPVRIG, también se añadió 0,5 µg/mL de puromicina (Gibco) al medio para la selección positiva. Para el análisis FACS, se recolectaron todas las líneas celulares en fase de crecimiento log y se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-PVRIG humana (IgG1 humana, hIgG1) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como una serie de valoración de 8 puntos comenzando a 30 µg/mL sobre hielo durante 30 minutos-1 hora. La serie de valoraciones se realizó como diluciones en serie 1:3 o 1:3,3. Los datos fueron adquiridos usando un FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizaron usando el software FlowJo (Treestar) y Prism (Graphpad).

Análisis FACS de líneas celulares humanas: se usaron las siguientes líneas celulares para determinar la expresión y la especificidad de los anticuerpos anti-PVRIG humana: Jurkat, CA46, NK-92, OV-90, HepG2 y NCI-H441. Las células

Jurkat, CA46 y NCI-H441 fueron cultivadas en medio RPMI + 10% de suero fetal de ternero, glutamax, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato sódico (Gibco) y penicilina/estreptomicina (Gibco). Se cultivaron células NK-92 en medio RPMI + 25% de suero fetal de ternero, glutamax, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y 500 U/mL de IL-2 (R&D systems). Las células OV-90 fueron cultivadas en una mezcla 1:1 de medio MCDB 105 (Sigma) que contiene una concentración final de 1,5 g/L de bicarbonato sódico (Life Technologies) y Medio 199 (Sigma) que contiene una concentración final de 2,2 g/L de bicarbonato sódico con una concentración final de 15% de suero fetal de ternero. Las células HepG2 fueron cultivadas en DMEM + 10% de suero fetal de ternero + glutamax. Para el análisis FACS, todas las líneas celulares fueron recolectadas en fase de crecimiento log y se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-PVRIG humana (hIgG1) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como una serie de valoración de 8 puntos comenzando a 30 µg/mL sobre hielo durante 30 minutos-1 hora. La serie de valoraciones se realizó como diluciones en serie 1:3 o 1:3,3. Los datos fueron adquiridos usando un FACS Canto II y se analizaron usando el software FlowJo y Prism.

Análisis FACS de leucocitos primarios humanos vírgenes: se obtuvieron leucocitos primarios mediante aislamiento de gradiente Ficoll (GE Healthcare) de sangre periférica (Stanford Blood Bank). Los leucocitos como células mononucleares de sangre periférica aisladas (PBMC) fueron congelados en nitrógeno líquido a una densidad de entre $1x10^7$ y $5x10^7$ células/mL en una mezcla de 10% DMSO (Sigma) y 90% de suero fetal de ternero. Para determinar la expresión proteínica de PVRIG en PBMC, se diseñaron cócteles de anticuerpos para los principales subconjuntos inmunes que incluyeron anticuerpos anti-PVRIG humana. Los anticuerpos anti-PVRIG humana (hIgG1) y sus respectivos controles fueron añadidos en diluciones de punto individual (5 µg/mL), o en algunos casos, como series de valoración de 8 puntos comenzando a 10 o 30 µg/mL sobre hielo durante 30 minutos-1 hora.

Resumidamente, se añadieron las mezclas de cócteles de anticuerpos a PBMC resucitadas que fueron sembradas a $5x10^5$ – $1x10^6$ células/pocillo tras un bloqueo previo de receptor Fc y tinción vivo/muerto (Aqua Live/Dead, Life Technologies). Los cócteles de anticuerpos fueron incubados con PBMC durante 30 minutos-1 hora en hielo. A continuación las PBMC fueron lavadas y se adquirieron los datos mediante FACS usando un FACS Canto II. Los datos fueron analizados usando software FlowJo y Prism. Los subconjuntos inmunes que fueron analizados incluyeron células CD56 dim NK, células CD56 bright NK, células T CD4+, células T CD8+, células T no convencionales (p.ej., células NKT y células T), células B y monocitos.

Análisis FACS de linfocitos efectores humanos activados: en algunos casos, se determinó la expresión de PVRIG en subconjuntos de linfocitos efectores activados tanto aislados como de PBMC enteras o en preparaciones de PBMC enteras. Los linfocitos efectores fueron estimulados con combinaciones de citoquinas, combinaciones de anticuerpos y citoquinas, o productos patogénicos. Se llevó a cabo un análisis FACS de la expresión de PVRIG en las células activadas análogo al descrito anteriormente para leucocitos primarios vírgenes.

Para estudiar la expresión de PVRIG en células NK estimuladas, se aislaron células CD56+ y se cultivaron en varios cócteles de citoquinas durante 1-3 días en medio de células NK (RPMI + 10% de suero fetal de ternero, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico y beta-mercaptoetanol [Gibco]). Las células NK fueron clasificadas usando microperlas CD56+ anti-humana (Miltenyi Biotec) o el kit de aislamiento de células NK humanas (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Los cócteles de citoquinas usados para estimular las células NK incluyeron IL-2, IL-12, IL-15, IL-2/IL-12, IL-2/IL-15, IL-12/IL-15 (R&D systems).

Para estudiar la expresión de PVRIG en células T estimuladas, se aislaron células T CD4+ y CD8+ usando microperlas CD4+ o CD8+ (Miltenyi Biotec). Las células aisladas fueron cultivadas durante 3 días en presencia de diversas condiciones activantes en medio de células T (RPMI + 10% de suero fetal de ternero, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico). Las condiciones usadas para estimular células T aisladas incluyen la estimulación con “dynabeads” humanas (perlas acopladas a anticuerpos CD3/CD28, Life Technologies) con IL-2 o cócteles de citoquinas que dirigen las células T a determinados fenotipos (p.ej., Th1, Th2, Th17 y fenotipos T reguladores). Las citoquinas que dirigen Th1 son IL-12 recombinante (R&D systems) y un anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (Biolegend). Las condiciones que dirigen Th2 son IL-4 recombinante (R&D systems) y un anticuerpo neutralizante anti-IFN-gamma (Biolegend). Las condiciones que dirigen Th17 son IL-6 recombinante (R&D systems), TGF-beta (R&D systems), IL-23 (R&D systems) y anticuerpos neutralizantes anti-IL-4 y anti-IFN-γ. Las condiciones que dirigen T reguladoras son TGF-beta e IL-2, y anticuerpos neutralizantes anti-IL-4 y anti-IFNγ.

Alternativamente, las células T activadas también fueron analizadas en cultivos de PBMC estimuladas enteras con antígeno de enterotoxina B estafilococal (SEB) (List Biological Laboratories) durante 3 días, o en una reacción de linfocitos mixta (MLR) donde se co-cultivan células T CD4+ con células dendríticas alogénicas durante 2 o 5 días.

Análisis FACS de monocitos polarizados humanos: Se determinó la expresión de PVRIG en células dendríticas derivadas de monocitos polarizados. En este ejemplo, se enriquecieron células CD14+ usando enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep según las instrucciones del fabricante. Después del enriquecimiento de células CD14+, los monocitos fueron polarizados a células dendríticas tras cultivo con GM-CSF (R&D systems) e IL-4 (R&D systems) durante 4 días en RPMI + 10% de suero fetal de ternero, glutamax, penicilina/estreptavidina, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico y beta-mercaptoetanol.

Análisis de expresión de ARN de líneas celulares humanas y leucocitos mediante qPCR: las líneas celulares que fueron evaluadas para determinar la expresión de ARN mediante qPCR fueron células Jurkat, CA46, Daudi, Raji y expi 293. Las células Jurkat, CA46, Raji y Daudi fueron cultivadas en medio RPMI + 10% de suero fetal de ternero, glutamax, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, y penicilina/estreptomicina. Se cultivaron células expi 293 en DMEM + 10% de FCS + glutamax. Se analizó el ARN de OV-90, HepG2 y NCI-H441 mediante un cribado bioinformático del atlas de líneas celulares. Para aquellas líneas celulares que fueron evaluadas en términos de expresión de ARN mediante qPCR, las células fueron recolectadas en fase de crecimiento log y se recolectó 1.000.000 de células, se lavaron con PBS, y se lisaron en 350 µL de tampón RLT (Qiagen). Las células lisadas en tampón RLT fueron almacenadas a -80ºC hasta uso.

Los leucocitos primarios que fueron evaluados para determinar la expresión de ARN fueron células NK CD56+, células T CD4+, células T CD8+ y monocitos CD14+. Las poblaciones celulares fueron aisladas usando kits de selección positivos para CD56+, CD4+, CD8+ y CD14+ humanos, según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Tras una clasificación, las células fueron lisadas en 350 µL de tampón RLT y almacenadas a -80ºC hasta uso. En algunos casos, los subconjuntos de PBMC activadas (condiciones de activación descritas anteriormente) fueron recolectados del cultivo y lisados en 350 µL de tampón RLT y se almacenaron a -80ºC hasta uso.

En el día de su utilización, se generó ARN a partir de las células lisadas usando el mini kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems. Se llevó a cabo la qPCR usando ADNc con cebadores Taqman (ThermoFisher) y el mastermix avanzado rápido Taqman de Applied Biosystems. El conjunto de cebadores de PVRIG usado fue el número de catálogo Taqman Hs04189293_g1. El conjunto de cebadores domésticos de beta-actina usado fue el número de catálogo Taqman Hs0 1060665 _g1. Se evaluó la expresión de tránscrito cuantificando los valores Ct y la expresión relativa se calculó con el método 2(-ΔΔCt). Los datos se adquirieron en un instrumento Step One Plus de Applied Biosystems.

Análisis FACS de células sobre-expresadoras modificadas de PVRIG de cynomolgus: se usaron las siguientes líneas celulares para determinar la reactividad cruzada de anticuerpos anti-PVRIG humana con PVRIG de cynomolgus (cPVRIG): células expi progenitoras y células expi sobre-expresadoras de cPVRIG. Estas células fueron cultivadas en DMEM + 10% de suero fetal de ternero + glutamax. Se generaron células expi sobre-expresadoras de cPVRIG transitorias electroporando ADN de cPVRIG en células expi progenitoras usando el sistema de transfección Neon. Para el análisis FACS, se usaron células expi cPVRIG entre 1-3 días después de la transfección. Las células expi progenitoras fueron recolectadas de la fase de crecimiento log. Se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo de cada tipo en placas de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-PVRIG humana (hIgG1) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como una serie de valoraciones de 8 puntos comenzando en 100 µg/mL en hielo durante 30 minutos-1 hora. La serie de valoraciones se llevó a cabo en diluciones en serie 1:3 o 1:3,3. Los datos fueron adquiridos con un FACS Canto II y analizados usando software FlowJo y Prism.

Análisis FACS de leucocitos de mono cynomolgus primarios vírgenes: se obtuvieron leucocitos de mono cynomolgus (cyno) primarios de sangre fresca extraída no más de 24 horas antes del análisis de expresión. La sangre se tomó de Bioreclamation. Para determinar la expresión proteínica de PVRIG en PBMC de cyno, se diseñaron cócteles de anticuerpos para los principales subconjuntos inmunes, que incluyeron anticuerpos anti-PVRIG humana. Los anticuerpos anti-PVRIG humana (hIgG1) y sus respectivos controles fueron añadidos en diluciones de punto único (5 µg/mL).

Resumidamente, las mezclas de cóctel de anticuerpos se añadieron a PBMC que fueron sembradas a $5x10^5 – 1x10^6$ células/pocillo tras bloqueo previo de receptor Fc y tinción vivo/muerto. Los cócteles de anticuerpos se incubaron con PBMC durante 30 minutos-1 hora en hielo. A continuación las PBMC fueron lavadas y se adquirieron los datos mediante FACS usando un FACS Canto II. Los datos fueron analizados usando el software Prism. Los subconjuntos inmunes analizados incluyen linfocitos CD16+, monocitos/células mieloides CD14+/CD56+ y células T CD3+.

Análisis de expresión de ARN de leucocitos primarios de mono cynomolgus: los leucocitos primarios que fueron evaluados para determinar la expresión de ARN fueron los subconjuntos CD56+, CD16+ y CD56-/CD16-. Las poblaciones celulares fueron aisladas usando kits de selección CD56 y CD16 positivos de primate no humano según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Tras una clasificación, las células fueron lisadas en 350 µL de tampón RLT y se almacenaron a -80ºC hasta uso.

En el día de su utilización, se generó ARN a partir de las células lisadas usando el mini kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems. Se llevó a cabo la qPCR usando ADNc con cebadores Taqman y el mastermix avanzado rápido Taqman de Applied Biosystems. Se diseñaron dos conjuntos de cebadores para detectar PVRIG de cyno por parte de Compugen USA, Inc. y fueron fabricados por Genscript. La secuencia y los códigos de cebador son:

Conjunto de cebadores 1

Directo: CTTGTGTTCACCACCTCTGG

Inverso: TGTTCTCATCGCAGGAGGTC

Conjunto de cebadores 2

Directo: TTGGCTGTGGATACCTCCTT

Inverso: ATAAGGGTCGTGGAGAGCAG

Se usaron cebadores de beta-actina para domésticos y el conjunto de cebadores usado fue el número de catálogo Taqman Mf04354341 _g1. Se evaluó la expresión de los tránscritos cuantificando los valores Ct y la expresión relativa se calculó con el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Los productos generados con los cebadores de PVRIG y los cebadores de beta-actina también fueron evaluados en tamaño mediante RT-PCR tradicional usando un gel de agarosa al 2,5%. Los datos de qPCR se adquirieron usando un instrumento Step One Plus de Applied Biosystems.

Resultados

Los anticuerpos de PVRIG reconocen PVRIG en células sobre-expresadoras: Para realizar una criba de anticuerpos específicos de PVRIG, se evaluó la capacidad de los anticuerpos generados a partir de una campaña de fagos para unirse a líneas de células HEK que fueron modificadas para sobre-expresar PVRIG. La mayoría de los anticuerpos de esta campaña tras reformatear la IgG1 humana se unieron a células HEK hPVRIG, aunque con afinidad variable. Además, la mayoría de estos anticuerpos también mostró una baja unión de fondo a las líneas celulares HEK progenitoras, lo que indica una elevada especificidad hacia la PVRIG. La Figura 27 muestra un ejemplo de la especificidad de los anticuerpos de PVRIG. En la Figura 31 se muestra un resumen de todas las características de unión de los anticuerpos hacia células HEK hPVRIG respecto al control que fueron generadas en dicha campaña de fagos.

El ARN de PVRIG humana es expresado en un abanico de líneas celulares cancerosas: Para realizar un escrutinio inicial de líneas celulares que podrían usarse para determinar la expresión de PVRIG por parte de anticuerpos, se examinó el atlas de líneas celulares de cáncer para obtener líneas que fueran elevadas para ARN de PVRIG según se determina por medios bioinformáticos. Se encontraron cuatro líneas celulares que eran fácilmente accesibles comercialmente y que eran grandes expresadoras de ARN de PVRIG, y se eligieron para validación mediante análisis de qPCR. Estas líneas celulares fueron Jurkat, CA46, Raji y Daudi.

Cuando se llevó a cabo el análisis de qPCR, se detectó ARN de PVRIG en las cuatro líneas celulares, en consonancia con el análisis bioinformático (Figura 28). Como control negativo se incluyeron células expi que presentaban una expresión de ARN de PVRIG relativamente baja.

El ARN de PVRIG humana es expresado en células T y células NK: Para realizar un cribado inicial de PBMC para obtener subconjuntos con probabilidad de ser positivos en proteína PVRIG según se detecta con nuestros anticuerpos, se realizó una clasificación de los principales subconjuntos de PBMC y se examinó la expresión de ARN de PVRIG mediante qPCR. Se compararon los niveles de ARN de PVRIG en células NK CD56+, células T CD4+, células T CD8+ y monocitos CD14+ con los de las líneas celulares Jurkat, HEK progenitoras y HEK hPVRIG. Tal como se muestra en la Figura 29, se detectó ARN de PVRIG en la mayor cantidad y hasta 50 veces superior en las células T CD4+, las células T CD8+ y las células NK CD56+, normalizadas respecto a células HEK GFP. De forma similar a la Figura 28, las células Jurkat también mostraron una expresión positiva. Por el contrario, los monocitos CD14+ no mostraron una mayor expresión de PVRIG respecto a las células HEK GFP, lo que indica una muy baja expresión de ARN de PVRIG.

Además de analizar PBMC vírgenes, también se activaron poblaciones seleccionadas (linfocitos efectores) en diversas condiciones de estimulación y se evaluó la expresión de ARN de PVRIG. Más específicamente, se activaron células NK con diversas combinaciones de citoquinas estimuladoras, mientras que se activaron policlonalmente células T con *dynabeads* activadoras humanas o con enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) con o sin citoquinas de polarización (ver la sección de protocolos para más detalles). Tal como se muestra en la Figura 30A y B, la expresión de ARN de PVRIG aumentó de forma general tanto en células NK como en células T con las diversas condiciones de estimulación, cuya extensión dependió del donante individual. Más específicamente, la Figura 30a muestra la expresión de ARN de PVRIG en células T CD4 y células NK vírgenes y activadas. La Figura 30b muestra la expresión de ARN de PVRIG en células T CD8 vírgenes y activadas.

Los anticuerpos de PVRIG reconocen la proteína PVRIG en células NK de una forma más prominente en subconjuntos inmunes primarios vírgenes y activados: Tras confirmar el patrón de expresión de ARN de la expresión de ARN de PVRIG en subconjuntos de PBMC vírgenes y activados, se usó nuestro panel de anticuerpos de PVRIG para determinar la expresión de proteína. En primer lugar, se determinó la expresión de PVRIG en subconjuntos de PBMC vírgenes. La población que mostró el mayor nivel de PVRIG fue la de células NK. Las células T CD4+ y CD8+ mostraron niveles bajos de PVRIG, mientras que las células B y los monocitos no presentaron ninguna expresión detectable. En la Figura 32 se muestra un resumen de la expresión en células NK y en células T CD8+, según es detectada por nuestros anticuerpos. Otros subconjuntos menores también presentaron expresión de PVRIG e incluyeron células T no convencionales tales como células NKT y células T γδ. El patrón de expresión en los subconjuntos de PBMC fue muy similar en todos los donantes evaluados y analizados.

Cuando se evaluó la proteína PVRIG tras diversas condiciones de estimulación (que incluyen estimulación policlonal, estimulación por citoquinas, y MLR), no se observó ninguna regulación al alza robusta de PVRIG en ninguno de los subconjuntos de PBMC, que incluyen células NK y células T CD4+ y CD8+. Además, los monocitos que fueron polarizados *in vitro* a células dendríticas con GM-CSF e IL-4 no mostraron ninguna expresión de PVRIG detectable consistente con la observada en monocitos no polarizados.

PVRIG es detectada en líneas celulares por una proporción de los anticuerpos de PVRIG: Además del cribado de PBMC para expresión de proteína PVRIG, también se quiso entender si también era expresada en líneas celulares de cáncer. Usando las líneas celulares positivas identificadas mediante expresión de ARN (Figura 28), se eligió cribar nuestros anticuerpos en células Jurkat y CA46, ya que mostraron los valores Ct absolutos más bajos respecto a nuestro gen doméstico. También se eligió un abanico de líneas celulares negativas para validar adicionalmente la especificidad de nuestros anticuerpos, que incluyó OV-90, NCI-H441 y HepG2. Una proporción de nuestros anticuerpos detectó la expresión de proteína PVRIG en células Jurkat y CA46 (Figura 31), pero no las líneas celulares negativas. En la Figura 33 se muestra un ejemplo de detección de PVRIG en Jurkat y CA46 con un anticuerpo representativo, CPA.7.021. La expresión en Jurkat y CA46 estuvo totalmente en consonancia entre ellas y la intensidad de expresión fue similar en ambas líneas celulares.

Los anticuerpos de PVRIG detectan PVRIG de cynomolgus expresada transitoriamente en células expi: Con el objetivo de determinar la adecuación pre-clínica de nuestros anticuerpos anti-PVRIG humana para estudios farmacológicos en mono cynomolgus, se quiso comprender si nuestros anticuerpos eran capaces de reaccionar de forma cruzada con PVRIG de cynomolgus (cPVRIG). Una proporción de nuestros anticuerpos fueron capaces de detectar cPVRIG que había sido transfectada transitoriamente en células expi (Figura 29). En la Figura 34 se muestra un ejemplo de anticuerpo que dio lugar a tinción negativa (CPA.7.021) y uno que dio lugar a tinción positiva (CPA.7.024).

El ARN de PVRIG es detectado en PBMC de cynomolgus: Antes de la determinación de la proteína PVRIG en PBMC de cyno, en primer lugar se quiso determinar el perfil de expresión de ARN de PVRIG en subconjuntos de PBMC de cyno. Como no existía un conjunto de cebadores de cPVRIG, se diseñaron dos conjuntos que fueron dirigidos a dos sitios distintos del gen de cPVRIG. Un primer conjunto de cebadores era específico de la variante X2 de cPVRIG, mientras que el otro conjunto era capaz de recoger tanto la variante X1 como la X2. Tal como se muestra en la Figura 35, ambos conjuntos de cebadores fueron capaces de detectar ARN de cPVRIG en un nivel similar cuando se compararon el uno con el otro. Adicionalmente, al contrario que las PBMC humanas en las que no se observó una firma de ARN de PVRIG distinta en linfocitos efectores (células NK y T) en comparación con monocitos, el ARN de cPVRIG fue expresado en un nivel similar en todos los subconjuntos de PBMC de todos los donantes evaluados.

La expresión de proteína PVRIG en PBMC de cynomolgus es muy baja o negativa: Habiendo establecido un perfil de ARN de cPVRIG para PBMC de cyno, se realizó un cribado para determinar la presencia de proteína cPVRIG en PBMC de cyno usando un panel seleccionado de anticuerpos anti-PVRIG humana. Los anticuerpos elegidos para cribar PBMC se basaron en su capacidad para unirse a células transitorias de cPVRIG y/o su actividad funcional. Tal como se muestra en la Figura 36, se pudo detectar un nivel bajo de expresión de cPVRIG en el subconjunto de linfocitos CD16+ (células NK) de un abanico de anticuerpos, pero no en el subconjunto de linfocitos CD3+ (células T) ni en el subconjunto mieloide CD14+ CD56+ (monocitos). A pesar de estos datos, los anticuerpos que mostraron una detección positiva respecto al control (tal como denota la línea negra continua) no se correlacionaron con los que fueron capaces de unirse a las células transitorias de cPVRIG. Por ejemplo, el nivel de tinción con CPA.7.021 fue superior al de CPA.7.024 a pesar de que el primero no se une a las células transitorias de cPVRIG (ver la Figura 36).

Resumen y Conclusiones: usando una plataforma de fagos de anticuerpos, se ha podido generar con éxito anticuerpos monoclonales del antígeno PVRIG humano. Usando células modificadas sobre-expresadoras, así como un grupo de líneas celulares de cáncer, se ha demostrado que nuestros anticuerpos son altamente específicos para el antígeno PVRIG, y que son capaces de detectar la expresión de proteína que se correlaciona con la expresión de ARN. Tras análisis de subconjuntos de PBMC humanas, se ha demostrado que la proteína PVRIG se expresa más elevadamente en células NK, con una baja expresión en células T CD3+, y no es detectable en células B y células mieloides. La expresión no cambió de forma robusta tras exponer dichos tipos celulares a varias condiciones de estimulación. También se ha demostrado que un panel de nuestros anticuerpos reacciona de forma cruzada con el antígeno PVRIG de mono cynomolgus (cyno) a través de la evaluación de su unión a células sobre-expresadoras. Sin embargo, la combinación de un nivel bajo de unión a este panel de anticuerpos a PBMC de cyno, la carencia de correlación de proteína con ARN, y la discordancia de su capacidad para unirse a células sobre-expresadoras (en comparación con PBMC) indica que el antígeno PVRIG en PBMC de cyno puede ser muy bajo/negativo, o está expresado en una forma diferente/más compleja en comparación con las células sobre-expresadoras.

Ejemplo 1D:

Expresión de PVRIG en subconjuntos de PBMC de donantes sanos: Se evaluó la expresión de PVRIG en subconjuntos de PBMC de donantes sanos (la estrategia de clasificación se muestra en la Figura 1a). En las muestras evaluadas, se demuestra que la PVRIG es expresada en células T CD8+ (datos no mostrados), células T CD8α+ γδ (datos no mostrados), células T γδ doble negativas (datos no mostrados) y en menor extensión también en células T CD4+ (datos no mostrados) de PBMCs de donantes sanos (n=5).

Ejemplo 1E

Co-expresión de PVRIG con PD1, TIGIT y HLA-DR en ascitis de cáncer de ovario, PBLs de MSS, CRC, y en PBMCs sanas en reposo y alo-activadas: La PVRIG es co-expresada con TIGIT en células T CD8+ en ascitis de cáncer de ovario (datos no mostrados). En esta muestra, se observó un nivel mixto de expresión de PVRIG, que solapaba con el de expresión de PD-1. Un nivel bajo de HLA-DR se correlacionó con un nivel bajo de expresión de PVRIG. Se observó un nivel muy bajo de PVRIG en células T CD4+ en esta muestra específica, que indica que no hay correlación con PD1, TIGIT y HLA-DR.

En PBLs de pacientes de MSS CRC, la PVRIG es co-expresada con TIGIT en células T CD8+ (datos no mostrados). Se observaron niveles bajos de expresión de PVRIG en esta muestra, lo cual estaba en correlación con los niveles bajos de TIGIT y HLA-DR. Los TILs de este paciente presentaron una pequeña población de CD8+ que dio positivo en la tinción para PVRIG superficial, que también fue positivo para PD1 y TIGIT (datos no mostrados). La tinción intracelular reveló una tinción de PVRIG prominente que reprodujo el patrón de expresión de PD-1, mostrando dos poblaciones distintas que son PD1-PVRIG- y PD1+PVRIG+ (datos no mostrados). Las células T PVRIG+CD8+ intracelulares parecen correlacionarse mejor con las HLA-DR+ y TIGIT+. La PVRIG no fue detectable en la superficie de las células T CD4+ y solo una minoría de las células CD4+ se mostró positiva en la tinción intracelular de PVRIG en la población PD1+. Debido a la muy pequeña población PVRIG+ intracelular, es difícil determinar si la PVRIG es co-expresada con TIGIT y HLA-DR.

En PBMCs sanas, la tinción de PVRIG en células T CD8 reprodujo el patrón de expresión de PD-1 y TIGIT, mostrando distintas poblaciones PD1-PVRIG- y PD1+PVRIG+ y distintas poblaciones TIGIT-PVRIG- y TIGIT+PVRIG+ (datos no mostrados). No se detectó PVRIG en células CD4+. De forma interesante, tras la alo-activación, se observó co-expresión de PVRIG y PD-1 en CD4+ (pero no en CD8+) (datos no mostrados).

En resumen, se demostró que la PVRIG es co-expresada con TIGIT en células T CD8+ de ascitis de cáncer de ovario, PBLs de paciente de MSS CRC y con PD-1 de PBMCs de donante sano y con PD1 en células T CD4+ de PBMCs alo activadas de donante sano.

Ejemplo 1F

Expresión de PVRIG en poblaciones de linfocitos de PBMCs sanas, cáncer de uraco, cáncer colorrectal, ascitis de cáncer de ovario y cáncer de pulmón: Resultados: Se analizó la expresión de PVRIG en células T CD4+ y CD8+, células NK y en células NKT CD4+ y CD8+ en PBMCs de donante sano y en amígdalas y en TILs de cáncer de uraco, cáncer colorrectal, ascitis de cáncer de ovario, cáncer de pulmón y melanoma.

En PBMCs de donantes sanos (n=5) y en TILs de ascitis de cáncer de ovario (n=1) se detectaron niveles elevados de expresión de PVRIG en células NK (datos no mostrados) y células NKT CD8+ (datos no mostrados) y en menor medida también en células T CD8+ (datos no mostrados) y en NKT CD4+ (datos no mostrados). Las células T CD4+ también dieron positivo en tinción para PVRIG en algunas de las PBMCs, sin embargo el nivel de expresión fue bastante bajo (datos no mostrados).

Adicionalmente, se detectó la expresión sobre células T CD4+ en dos de 6 TILs de cáncer colorrectal evaluados, y en TILs de cáncer de pulmón (n=3) (datos no mostrados) y en células NK de TILs de cáncer de uraco (n=1).

No se detectó expresión de PVRIG en TILs de melanoma debido a la ausencia de TILs en la muestra evaluada.

Ejemplo 1G

Se realizaron evaluaciones adicionales para identificar tejidos de adición que sobre-expresan PVRIG en líneas celulares humanas y de ratón.

Reactivos: sondas TaqMan de PVRIG humana (Life technologies) Hs04189293_g1, Nº Cat. 4331182, sonda TaqMan para gen doméstico (HSKG) (Life technologies), RPL19 Mm 01577060_gH humana, HPRT1 Hs02800695_m1 humana, SDHA Hs00417200_m1 humana, PBGD Hs00609296_g1 humana, y TATA Box Hs00375874_g1 humana. Sondas TaqMan de PVRIG de ratón (Life technologies) CC70L8H, sondas TaqMan CC6RN19 Custom. Sondas TaqMan para gen doméstico (HSKG) (Life technologies) RPL19: Mm02601633_g1 de ratón. ABI TaqMan Fast Advanced Master mix, parte nº 4444557, Applied Biosystem. Las líneas de células cancerosas humanas y de ratón comerciales de la “American Type Culture Collection” (ATCC) y el CLS (Cell line service) se detallan en la Tabla 1. La extracción de ARN de las líneas celulares humanas y de ratón se llevó a cabo con el Mini Kit RNAeasy (Qiagen nº cat. 74014). El ADNc fue producido usando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems nº cat. 4368814). Ab anti-PVRIG policlonal de ratón commercial MaxPab (B01), Abnova, nº cat. H00079037-B01, diluido 1:200. IgG1 de ratón, Life Technologies, nº cat. MG 100, diluido 1:200. Ab anti-PVRIG policlonal de ratón comercial, Sigma, nº cat. SAB1407935, 10 µg/mL. IgG de ratón Chrom puro, molécula entera, Jackson, nº cat. 015-000-003, 10 µg/mL. Anti-PE de ratón de cabra, Jackson, nº cat. 115-116-146, diluido 1:100. Anti-PVRIG de ratón policlonal de cabra a medida, lote nº 20153456C.1, Aldevron, 10 µg/mL. IgG total de rata a medida, lote nº GV20884.1, Aldevron, 10 µg/mL. Anti-PE de rata de cabra, Jackson, nº cat. 112-116-143, diluido 1:100. Anti-PVRIG humana-CPA.7.024 mIgG1 conjugado a AF647, 10 µg/mL. Anti-PVRIG humana-CPA.7.050 mIgG1 conjugado a AF647, 10 µg/mL. Anti-PVRIG

humana-CPA.7.005 mIgGl conjugado a AF647, 10 µg/mL. Anti-PVRIG humana-CPA.7.002 mIgG1 conjugado a AF647, 10 µg/mL. IgG1 Synagis conjugado a A647, 10 µg/mL. Anti-PVRIG humana-CPA.7.021 mIgG1 conjugado a AF647, 10 µg/mL. IgG2 Synagis conjugado a A647, 10 µg/mL. Ab anti-PVRIG policlonal de conejo, Sigma, nº cat. HPA047497, diluido 1:300. Anti-HRP de conejo de cabra, Jackson, nº cat. 111-035-003, diluido 1:100. VioBlue, tinción de viabilidad fijable 450, BD Bioscience, nº cat. 562247, diluido 1:1000. Trustaína FcX humana, Biolegend, nº cat. 422302. Bloque Fc anti-CD16/CD32 de ratón de rata, BD, nº cat. 553142. Disolución de electroporación Ingenio, Mirus, nº cat. MIR50114. siARN de PVRIG humana ON-TARGETplus - SMARTpool, Dharmacon, nº cat. L-032703-02. ON TARGET más siARN no dirigido, Dharmacon, nº cat. D-001810-01-05. Las líneas celulares humanas usadas en el estudio se muestran en la Figura 54.

Expresión de tránscrito. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR): se llevó a cabo una extracción de ARN (1-5 µg) de líneas celulares humanas y de ratón (detalladas anteriormente en las Tablas 1 y 2) según los protocolos del fabricante. Se preparó el ADNc siguiendo los protocolos del fabricante (1 µg de ARN diluido en 20 µL de mezcla de ADNc). El ADNc, preparado como se ha descrito anteriormente, diluido 1:10 (lo que representa 25 ng de ARN por reacción), se usó como plantilla para las reacciones de qRT-PCR, usando sondas TaqMan específicas de gen (detallado en la sección de materiales y métodos 1.1 1-4). La detección se llevó a cabo usando el dispositivo QuantStudio 12k. Se registró el ciclo en el que las reacciones alcanzaron un nivel umbral de fluorescencia (Ct = Ciclo umbral) y se usó para calcular la cantidad de tránscrito relativa en las reacciones RT. La cantidad absoluta se calculó usando la ecuación Q=2^-Ct. Las cantidades relativas resultantes fueron normalizadas a las cantidades relativas de gen doméstico, mRPL19 o hRPL19.

Detección de la expresión de proteína mediante Transferencia Western (WB): se analizó la expresión de PVRIG humana en líneas celulares humanas mediante WB usando extractos celulares enteros (45 µg para las líneas de cáncer, y 30 µg para la línea celular sobre-expresadora y la línea celular de control negativo). pAb anti-PVRIG humana policlonal de conejo comercial, Sigma, nº cat. HPA047497, diluido 1:300 en 5% de BSA/TBST seguido de un Ab secundario anti-peroxidasa conjugada de conejo de cabra (Jackson, nº cat. 111-035-003), diluido 1:20.000 en 5% de leche TBST.

Análisis de la expresión de proteína mediante Citometría de Flujo (FACS): se analizó la expresión en superficie celular de la proteína PVRIG mediante FACS. Se tiñeron las líneas celulares humanas o de ratón con reactivo VioBlue diluido 1:1000 en PBS. Las células fueron incubadas 15 minutos a R.T. y a continuación se lavaron una vez con PBS. Las líneas celulares para el análisis de proteína endógena fueron pre-incubadas con las disoluciones bloqueantes de receptor Fc enumeradas anteriormente en la sección de materiales (se usó 2,5 µL/reacción de bloqueante humano y 1 µL/reacción de bloqueante de ratón de acuerdo a los procedimientos del fabricante). Para detectar la proteína PVRIG humana, las células fueron teñidas con un anticuerpo policlonal anti-PVRIG humana o con mAbs anti-PVRIG humana monoclonales a medida (Inc. production, detallado anteriormente en la sección de materiales y métodos) diluidos a una concentración de 10 µg/mL o 1:200 (para Sigma Ab y mAb o para Abnova Ab, respectivamente) o control de isotipo IgG1 a la misma concentración seguido de Ab conjugado anti-PE de ratón de cabra.

Para detectar la proteína PVRIG de ratón, las células fueron teñidas con un pAb policlonal anti-PVRIG de ratón de rata a medida (Aldevron), diluido a una concentración de 10 µg/mL o con molécula completa de IgG de rata como control de isotipo a la misma concentración seguido de Ab conjugado anti-PE de rata de burro diluido 1:100.

Bloqueo de PVRIG: el bloqueo de PVRIG humana endógena se llevó a cabo mediante transfección transitoria de siARN. La transfección de 100 pmol de conjunto de siARN de PVRIG o de siARN revuelto se llevó a cabo mediante electroporación usando el dispositivo Amaxa nucleofector y la disolución de electroporación MIRUS Ingenio, tal como se ha descrito anteriormente en la sección de materiales y métodos, y de acuerdo al procedimiento del fabricante. 48 horas después de la transfección, las células fueron recolectadas para un análisis adicional mediante qRT-PCR y FACS.

Resultados: expresión endógena del tránscrito de PVRIG en líneas celulares humanas y de ratón mediante qRT-PCR.

Líneas celulares humanas: a fin de verificar la presencia del tránscrito de PVRIG en las líneas celulares humanas (enumeradas en la Figura 54), se llevó a cabo una qRT-PCR usando una sonda TaqMan específica como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Tal como se muestra en la Figura 56, se observó el tránscrito de PVRIG humana usando la sonda TaqMan Hs04189293_g1 con niveles relativamente elevados en las líneas celulares Jurkat (A, B), HUT78 (A, B) y HL60 (B). Se observó un menor nivel de tránscrito en las líneas celulares THP1, RPMI8226 (B). El resto de líneas celulares muestran muy poco o nada de tránscrito.

Expresión endógena del tránscrito de PVRIG en líneas celulares de ratón mediante qRT-PCR: Con el objetivo de verificar la presencia del tránscrito de PVRIG en líneas celulares de ratón (enumeradas en la Figura 55), se llevó a cabo una qRT-PCR usando una sonda TaqMan específica como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Tal como se muestra en la Figura 57, se observó tránscrito de PVRIG de ratón usando la sonda TaqMan CC70L8H con niveles relativamente elevados en las líneas celulares NIH/3T3, Renca, Sal/N y J774A.1 (A). Se observó un menor nivel de tránscrito en las líneas celulares CT26 (A) y B-104-1-1(B). El resto de líneas celulares muestran muy poco o nada de tránscrito.

Expresión endógena de las proteínas PVRIG en líneas celulares humanas mediante WB: se llevó a cabo un análisis WB para determinar la expresión endógena de proteína PVRIG en varios lisatos de líneas celulares de cáncer humanas, tal como se detalla en la Figura 54, usando pAb anti-PVRIG humana comercial (Sigma, HPA047497) como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos. Como control positivo, se usó extracto celular entero de un conjunto estable de células HEK293 que sobre-expresan PVRIG, mientras que las células transfectadas con un vector vacío sirvieron como control negativo. Tal como se muestra en la Figura 58, se detectó una banda de proteína que corresponde a ~35kD en el control positivo de células sobre-expresadoras HEK293 (calle 2), así como en la línea celular Jurkat (calle 3). No se detectó expresión de PVRIG humana en las células de vector vacío (calle 1) que sirvieron como control negativo, ni en la línea celular humana ZR75-1 (calle 4).

Expresión endógena de las proteínas PVRIG en líneas humanas y de ratón mediante FACS:

Línea celular humana: para verificar la expresión endógena en superficie celular de PVRIG humana, se evaluaron varias líneas celulares humanas (detalladas en la Figura 54) tal como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos. Las líneas celulares fueron teñidas con el Ab comercial (Abnova) o con control de isotipo seguido de un Ab secundario anti-PE de ratón de cabra. El análisis se llevó a cabo mediante FACS. Se observó la unión de anticuerpo Abnova en la línea celular humana de cáncer Jurkat, en comparación con la unión del control de isotipo. No se observó unión de Ab Abnova en las otras líneas celulares evaluadas: para Capan2 y ZR75-1, en comparación con la unión de control de isotipo, se realizó un análisis FACS adicional usando Ab comercial de Sigma en varias líneas celulares humanas (Jurkat, HUT78, Karpas299 y NK-YTS), se observó unión solo en células Jurkat, pero no se observó unión en el resto de líneas celulares (datos no mostrados).

Se realizó un análisis adicional para confirmación endógena de PVRIG humana en la línea celular Jurkat a través de la evaluación de la unión de varios anticuerpos monoclonales de la invención. La línea celular Jurkat se tiñó con cinco mAbs anti-PVRIG humana a medida (CPA.7.024, CPA.7.050, CPA.7.005, CPA.7.002 y CPA.7.021) conjugados con AF647 o con Ab de control de isotipo relativo conjugado a AF647. El análisis se llevó a cabo mediante FACS. Se observó la expresión de PVRIG humana en la línea celular humana Jurkat solo con CPA.7.021 y CPA.7.050, en comparación con la expresión del control de isotipo. No se observó unión a PVRIG humana en la línea celular Jurkat usando ninguno de los otros tres mAbs.

Línea celular de ratón: para verificar la expresión endógena en superficie celular de PVRIG de ratón, se evaluaron varias líneas celulares de ratón: J774A.1, NIH/3T3, SaI/N y Renca (detalladas en la Figura 55), tal como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos. Las líneas celulares fueron teñidas con el Ab anti-PVRIG de ratón de rata policlonal a medida (Aldevron), o con el control de isotipo (Aldevron) seguido de un Ab secundario anti-PE de rata de cabra. El análisis se llevó a cabo mediante FACS. No se observó unión a proteína PVRIG de ratón en ninguna de las líneas celulares de ratón evaluadas con el Ab policlonal de Aldevron (datos no mostrados).

Bloqueo de PVRIG humana en líneas celulares humanas: a fin de confirmar adicionalmente la expresión endógena de la proteína PVRIG en la línea celular Jurkat, se usó un conjunto de siARN de PVRIG humana para bloqueo, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. 48 horas después de la transfección de siARN, las células fueron recolectadas para un análisis adicional mediante qRT-PCR y FACS.

Bloqueo de PVRIG humana en líneas celulares humanas evaluado mediante qPCR: tal como se muestra en la Figura 59, el nivel de tránscrito de PVRIG humana en células Jurkat transfectadas con conjunto de siARN de PVRIG humana se ve reducido significativamente (barra de histograma derecha) en comparación con las células transfectadas con siARN mezclado (barra de histograma izquierda), analizado mediante qRT-PCR como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Bloqueo de PVRIG humana en líneas celulares humanas evaluado mediante FACS: se llevó a cabo un análisis FACS adicional de la expresión en membrana de PVRIG humana en las mismas células transfectadas con siARN. Tal como se muestra en la Figura 60, las expresiones en membrana de proteína PVRIG humana se ve reducida en las células transfectadas con siARN de PVRIG (verde para mAb CPA.7.021 o rojo para mAb de Sigma) en comparación con las células transfectadas con siARN mezclado (naranja). La tasa de cambio (anti-PVRIG frente a control de isotipo) en la línea celular Jurkat se redujo desde 8 a 3,3 veces usando el Ab de Sigma, o desde 15,3 veces a 2,8 veces usando el mAb CPA.7.021.

Este informe incluye datos preliminares de la expresión endógena de PVRIG en líneas celulares, tanto a nivel de ARN como a nivel de proteína, en líneas celulares humanas y de ratón.

Se evaluaron varias líneas celulares de cáncer humanas mediante qRT-PCR, WB y FACS en términos de expresión endógena de PVRIG.

Se observó la expresión en superficie celular de PVRIG humana en la línea celular Jurkat usando los Abs policlonales comerciales (Sigma y Abnova) y los Abs monoclonales de ratón (Inc), tal como se muestra en la Figura 4A y 4B, respectivamente. Estas observaciones están en correlación con los niveles de tránscrito de ARN mostrados en la Figura 1A y B, y con los resultados WB mostrados en la Figura 3.

Se realizó una confirmación adicional de PVRIG humana endógena en líneas celulares Jurkat mediante un experimento de bloqueo que confirma una clara reducción del tránscrito de ARN después de la transfección de siARN de PVRIG, tal como se muestra en la Figura 5, y también se observó una reducción en la expresión de proteína en superficie celular en las líneas celulares Jurkat, como se muestra en la Figura 6, con el Ab comercial y el Ab monoclonal.

Se evaluaron varias líneas celulares de ratón mediante qRT-PCR y FACS para determinar la expresión endógena de PVRIG. A nivel de tránscrito, se observó la presencia de PVRIG en las líneas celulares J774A.1, NIH/3T3, SaI/N y Renca, tal como se muestra en la Figura 2A y B. Aunque no se observó expresión en membrana de PVRIG de ratón en estas líneas celulares evaluadas detectada por Ab policlonal (Aldevron) (datos no mostrados). La Figura 61 y la Figura 62 indican el resumen de los descubrimientos descritos en este informe, destacando las líneas celulares que muestran una correlación entre qPCR y FACS, confirmada mediante bloqueo.

Ejemplo 1H

El objetivo de este experimento es evaluar la expresión de proteína PVRIG en TILs (linfocitos infiltrantes tumorales) humanos en reposo o activados, aislados de muestras de melanoma humano y propagados en presencia de antígenos específicos de melanoma e IL2. Se produjo mAb humano dirigido contra el dominio extracelular (ECD) de PVRIG humana. Estos Abs fueron marcados directamente con Alexa flour 647 a fin de examinar la expresión de PVRIG en células mediante análisis FACS.

Materiales y Métodos

TILs: En esta serie de experimentos se usaron tres linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) diferentes de metástasis extirpadas de tres pacientes de melanoma: 1) TIL-412-HLA-A2-Mart1 específico; 2) TIL-F4-HLA-A2-gp100 específico, y 3) TIL-209-HLA-A2-gp100 específico. Los TILs humanos (>90% CD8+) fueron descongelados 24h antes de comenzar el experimento. Las células fueron descongeladas en 12 mL de medio de TIL (IMDM + 10% de suero humano + 1% de Glutamax + 1% de Na-Piruvato + 1% de aminoácidos no esenciales + 1% de Pen-Strep) suplementado con 300 U/mL de rhIL2 (Biolegend 509129). Las células se dejaron recuperar de la congelación durante 24 horas.

Condiciones de ensayo: tras la recuperación, los TILs fueron evaluados en cuatro condiciones diferentes: 1) Reposo - con 300 U/mL de IL2 (Biolegend cat-589106), 2) Con activación policlonal de células T, usando 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 ligado a placa (eBioscience clon OKT3, cat-16-0037-85) + 2 µg/mL de ab anti-CD28 (eBioscience clon CD28.2 cat-16-0289-85) + 300 U/mL de IL2. 3) Co-cultivados (1:1) con células de melanoma (HLA-A2 negativas) Mel888 (LIMS ID: CL-216), y 4) Co-cultivados (1:1) con células de melanoma (HLA-A2 + Mart1/gp100 positivas) Mel624 (LIMS ID CL-218).

Después de 12 horas de reposo / activación / co-cultivo, las células fueron evaluadas mediante FACS para determinar la expresión de PVRIG, así como la expresión de otros miembros de la ruta PVRIG y otros marcadores superficiales.

Tinción de células: las células fueron recolectadas después de 12 horas y lavadas dos veces con PBS. Las células fueron teñidas a temperatura ambiente durante 20 minutos con PBS suplementado con 1/1000 de tinte de viabilidad fijable efluor 450 (BD horizon cat-562247). Después de la tinción, las células fueron lavadas dos veces con PBS y teñidas durante 15 minutos en hielo con tampón de FACS (PBS + 0,5% de BSA + EDTA 2 mM + 0,05% de Azide) suplementado con 1/25 de Truestain FC-Block humano (Biolegend, 422302). Tras bloqueo de Fc, las células fueron teñidas en hielo durante 30 minutos con los Abs y las concentraciones que se indican en la Tabla 1.

Anticuerpos	**Isotipo**	**Conjugado a**	**Fabricante**	**Nº de catálogo**	**Concentración (µg/µL)**	**Concentración de tinción**
Anti-PVRIG humana CPA.7.021	IgG2 humana	AF-647	Compugen - iNC	CPA.7.021	0,2	5 µg/mL
IgG2 humana control de isotipo	IgG2 humana	AF-647	Compugen - iNC		0,2	5 µg/mL
CD96	mIgG1	APC	Biolegend	338410	0,2	4 µg/mL
PVR	mIgG1	APC	Biolegend	337618	0,05	1 µg/mL
PVRL2	mIgG1	APC	Biolegend	337412	0,1	2 µg/mL
TIGIT	mIgG1	APC	eBioscience	17-9500-42	0,025	0,5 µg/mL
DNAM1	mIgG1	APC	Biolegend	338312	0,1	2 µg/mL
PD1	mIgG1	AF647	Biolegend	329910	0,1	2 µg/mL
CD8	mIgG1	FITC	Biolegend	300906	0,15	3 µg/mL

Tras tinción, las células fueron lavadas una vez y re-suspendidas en tampón FACS para análisis. Se realizó un calibrado de compensación usando perlas de compensación (BD, 552843). Una gota de perlas fue teñida durante 30

minutos con los anticuerpos anteriores. La tinción de perlas se realizó en las mismas concentraciones que la tinción de células. Después de la tinción de perlas, se llevó a cabo la compensación en una máquina MacsQuant FACS según el procedimiento estándar. Todas las muestras fueron adquiridas en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos fueron analizados usando el software Tree Star FlowJo (v10.0.8).

La PVRIG es expresada en TILs humanos en reposo: Se tiñeron TILs en reposo, cultivados durante 12 horas con 300 U/mL de IL2 solo, para expresión de PVRIG y se analizó mediante FACS. La estrategia de clasificación para TILs: los linfocitos fueron clasificados en primer lugar en función del tamaño y la granularidad en el gráfico FCS:SSC, a continuación se clasificaron células individuales según FSC-H y FSC-A, a continuación las células fueron clasificadas según la tinción de Colorante de viabilidad en el gráfico Vioblue:FSC, a continuación las células $CD8^+$ fueron clasificadas según la tinción CD8 en el gráfico CD8:FSC. Los niveles de expresión de PVRIG fueron representados entonces según la tinción de PVRIG en histogramas.

La expresión de PVRIG en TILs humanos se ve regulada a la baja tras activación con abs anti-CD3 + anti-CD28: Se tiñeron TILs humanos, cultivados durante 12 horas con abs anti-CD3 + anti-CD28 + IL2, para expresión de PVRIG y se analizaron mediante FACS. La expresión de PVRIG en la superficie de los tres TILs examinados se ve regulada a la baja tras activación, en comparación con los TILs en reposo (datos no mostrados).

La expresión de PVRIG en TILs humanos se ve regulada ligeramente a la baja tras co-cultivo con Mel888: Se tiñeron TILs humanos, cultivados durante 12 horas con células Mel888 para expresión de PVRIG y se analizaron mediante FACS. La expresión de PVRIG en la superficie de los tres TILs examinados se ve regulada ligeramente a la baja tras co-cultivo con Mel888, en comparación con los TILs en reposo.

La expresión de PVRIG en TILs humanos se ve regulada a la baja tras co-cultivo con Mel624: Se tiñeron TILs humanos, cultivados durante 12 horas con células Mel624 para expresión de PVRIG y se analizaron mediante FACS. La expresión de PVRIG en la superficie de los tres TILs examinados se ve regulada ligeramente a la baja tras co-cultivo con Mel624, en comparación con los TILs en reposo.

Expresión de otros miembros de la ruta en TILs en reposo: Se tiñeron TILs humanos, co-cultivados durante 12 horas con IL2 solo para la expresión de CD96, PVR, PVRL2, TIGIT y DNAM1, y se analizaron mediante FACS. CD96, TIGIT y DNAM1 son expresados en los tres TILs examinados. PVR es expresado sobre la superficie de los tres TILs también, pero en niveles relativamente bajos. No se detecta PVRL2 en ninguno de los TILs.

Expresión de otros miembros de la ruta en TILs activados con abs anti-CD3 y anti-CD28: Se tiñeron TILs humanos, co-cultivados durante 12 horas con abs anti-CD3 y anti-CD28 para la expresión de CD96, PVR, PVRL2, TIGIT y DNAM1, y se analizaron mediante FACS. Tras activación con abs anti-CD3 + anti-CD28, CD96 se ve regulado a la baja, PVR se ve regulado ligeramente al alza, TIGIT se ve regulado ligeramente al alza y DNAM1 se ve regulado ligeramente al alza también.

Expresión de otros miembros de la ruta en TILs co-cultivados con Mel888: Se tiñeron TILs humanos, co-cultivados durante 12 horas con células Mel888 para la expresión de CD96, PVR, PVRL2, TIGIT y DNAM1, y se analizaron mediante FACS. Tras co-cultivo con Mel888, CD96 se ve regulado al alza, PVR se ve regulado ligeramente al alza, TIGIT y DNAM1 se ven regulados a la baja, PVRL2 también se ve inducido ligeramente.

Expresión de otros miembros de la ruta en TILs co-cultivados con Mel624: Se tiñeron TILs humanos, co-cultivados durante 12 horas con células Mel624 para la expresión de CD96, PVR, PVRL2, TIGIT y DNAM1, y se analizaron mediante FACS. Se aplicó una estrategia de clasificación de acuerdo a la Figura 1. Tras co-cultivo con Mel624, CD96 se ve regulado a la baja, PVR se ve regulado muy al alza, TIGIT es estable o se ve regulado ligeramente al alza, DNAM1 se ve regulado a la baja y PVRL2 se ve inducido ligeramente.

Expresión de PD1 en TILs: Se tiñeron TILs humanos, cultivados durante 12 horas con IL2 solo o activados con abs anti-CD3 + anti-CD28 o co-cultivados con células Mel888 o con células Mel624, para la expresión de PD1 y se analizaron con FACS. Como puede observarse en la Figura 16 y las Figuras 17, PD1 es expresado solo en TIL412 en reposo. No se observó ningún cambio en la expresión de PD1 tras co-cultivo con Mel888, pero PD1 se ve regulado al alza en los tres TILs tras co-cultivo con Mel624 o tras activación con abs anti-CD3 + anti-CD28.

Resumen y conclusiones: Para todos los TILs evaluados:

- Ab anti-PVRIG CPA.7.021 tiñe TILs (hasta 2,6 veces).
- La expresión de PVRIG se ve regulada a la baja tras activación de 12 horas con abs anti-CD3 + anti-CD28 o tras co-cultivo con Mel624 (casi al nivel de fondo).
- Los TILs en reposo expresan CD96, TIGIT y DNAM1 (hasta 35, 12 y 79 veces, respectivamente).
- La expresión de CD96 se ve regulada a la baja tras activación (desde 35 hasta ~11 veces) o co-cultivo con melanoma irrelevante (HLA-A2-).
- La expresión de DNAM1 se ve regulada al alza tras activación con abs αCD3/CD28 (desde 79 a 102 veces) pero se ve regulada fuertemente a la baja tras co-cultivo de TILs con Mels (hasta 8 veces).

- La expresión de TIGIT se ve regulada a la baja ligeramente tras co-cultivo de TILs con la línea celular mel888, y permaneció estable con una ligera regulación al alza tras co-cultivo con Mel624 o tras activación con abs anti-CD3 + anti-CD28.
- La expresión de PD1 se ve regulada al alza tras activación (desde 0 hasta 18 veces).
- Se detectaron niveles elevados de PVR tras el co-cultivo de TILs con melanomas (desde <2 hasta 18 veces).

El TIL-412 en reposo muestra tinción positiva para PD1. El TIL-F4 también es ligeramente positivo para PD1, mientras que el TIL-209 es negativo. En la Tabla 2 se puede ver un resumen de los cambios en los niveles de expresión de todos los parámetros evaluados, en las diferentes condiciones.

Tabla 2:

	+IL2	+αCD3+αCD28+IL2	+Mel888	+Mel624
PVRIG	1.4 – 2.6	0 – 12	1.3 – 1.7	0 – 1.2
CD96	23 – 35	12.7 – 16	11.7 – 17.6	11.1 – 16.6
TIGIT	5.7 – 12.6	7.8 – 12.5	4 – 7.3	6.1 – 12.5
DNAM1	43 – 79	56 – 100	14 – 20	17 – 25
PVR	1.6 – 1.8	2.6 – 3.2	13.6 – 18	11 – 17
PVRL2	0	0	1.4 – 2.3	1.2 – 1.8
PD1	0 – 4.5	2.3 – 18.4	0 – 4.6	2 – 9.3

Ejemplo 1I: Expresión de PVRIG en células T y TILs humanos en reposo y activados

El objetivo de este ejemplo fue evaluar la expresión de la proteína PVRIG en células T CD4+ y CD8+ primarias aisladas humanas activadas, así como en TILs (linfocitos infiltrantes tumorales) aislados de muestras de melanoma humano y propagados en presencia de antígenos específicos de melanoma e IL2. Se produjeron mAbs humanos contra el dominio extracelular (ECD) de PVRIG humana. Estos Abs fueron marcados directamente con Alexa flour 647 a fin de examinar la expresión de PVRIG sobre las células mediante análisis FACS.

Materiales y Métodos

TILs: en esta serie de experimentos, se usaron dos TILs diferentes, de metástasis extirpadas de tres pacientes de melanoma:

TIL-Mart1-HLA-A2-Mart1 específico

TIL-209-HLA-A2-gp100 específico

TILs humanos (>95% CD8+), fueron descongelados 24h antes de comenzar el experimento. Las células fueron descongeladas en 12 mL de medio de TIL (IMDM + 10% de suero humano + 1% de Glutamax + 1% de Na-Piruvato + 1% de aminoácidos no esenciales + 1% de Pen-Strep) suplementado con 300 U/mL de rhIL2 (Biolegend 509129). Las células se dejaron recuperar de la congelación durante 24 horas.

Células T primarias: en esta serie de experimentos se usaron dos donantes diferentes:

CD4+ y CD8+ del donante nº147

CD4+ y CD8+ del donante nº186

Células primarias humanas (>95% de pureza), fueron descongelados 24h antes de comenzar el experimento. Las células fueron descongeladas en medio completo RPMI (RPMI + 10% de FBS + 1% de Glutamax + 1% de Na-Piruvato + 1% de Pen-Strep) suplementado con 300 U/mL de rhIL2 (Biolegend 509129). Las células se dejaron recuperar durante 24 horas.

Condiciones de ensayo: tras la recuperación, las células fueron activadas usando una activación policlonal de células T, usando 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 ligado a placa (BD-pharmingen clon Ucht-1, cat-555329), 2 µg/mL de ab anti-CD28 (eBioscience clon CD28.2 cat-16-0289-85) y 300 U/mL de IL2.

La activación se llevó a cabo durante 24h, 48h, 72h y 144h.

Tinción de células: las células fueron recolectadas y lavadas con PBS. Las células fueron teñidas a temperatura ambiente durante 10 minutos con PBS suplementado con 1/1000 de tinte de viabilidad fijable efluor 450 (BD horizon cat-562247). Después de la tinción, las células fueron lavadas dos veces con PBS y teñidas con los Abs a la concentración indicada en la Figura 65 durante 30 minutos en hielo con tampón de FACS (PBS + 0,5% de BSA + EDTA 2 mM + 0,05% de Azide) y las concentraciones fueron las indicadas en la Figura 65. Tras la tinción, las células fueron lavadas una vez y re-suspendidas en tampón FACS para análisis.

Resultados: se dejaron células T humanas de dos donantes diferentes y TILs sin tratar (en reposo) o fueron estimuladas policlonalmente a varios tiempos tal como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se evaluó el estado de activación celular mediante la detección de la expresión superficial de CD137 y PD-1 para cada tiempo en comparación con el control de isotipo (FMO), tal como se muestra para las células T CD8+, CD4+ y TILs activados (Figura 70A, B y C, respectivamente). Como era de esperar, tras la activación se detectó y se elevó la expresión de PD-1 y CD137 (Figura 70A, B y C).

La expresión de PVRIG se observó tanto en células T CD4+ como CD8+, con una mayor expresión en células CD8+ (de 6-8 veces) en comparación con las células CD4+ (de 3 veces), y disminuyó tras activación (Figura 71A, B y C). En la activación de 3-6 días, la expresión de PVRIG aumentó en las células T CD8+ (4-5 veces) y CD4+ (2-3 veces), como puede observarse en la Figura 71.

Adicionalmente, también se observó expresión de PVRIG en TILs Mart1 y 209 en reposo, y la expresión disminuyó tras la activación (Figura 72A, B y C). En la activación de 3-6 días, la expresión de PVRIG aumentó, como puede observarse en la Figura 72, en comparación con la activación de 1-2 días.

Ejemplo 2: Generación y caracterización de conjuntos celulares transfectantes estables que expresan PVRIG

Se generaron conjuntos celulares recombinantes de líneas celulares que sobre-expresan PVRIG humana y proteína de ratón, para uso en la determinación de los efectos de la PVRIG sobre la inmunidad, para caracterización de la PVRIG y para identificar agentes terapéuticos inmunoreguladores basados en PVRIG.

Materiales y Métodos:

Reactivos: Construcciones de ADN:

PVRIG humana flag pUC57

PVRIG humana flag pCDNA3.1

PVRIG humana flag pMSCV

Células recombinantes:

HEK293 pCDNA3.1 Humanas PVRIG flag

HEK293 pMSCV Humanas PVRIG flag

Anticuerpos comerciales:

Anti-PVRIG, Sigma cat. HPA047497 – Policlonal de conejo

Anti-PVRIG, Abnova cat. H00079037-B01 – Policlonal de ratón

La validación de longitud completa de PVRIG de ratón se realizó usando reacciones PCR y secuenciando los productos de PCR.

Se usaron tres parejas de cebadores (Tabla 3).

Tabla 3: Secuencias de cebadores usados para la validación de longitud completa de ratón.

Nombre de cebador	Secuencia
200-554 mPVRIG –F	CCACCAACCTCTCGTCTTTC
200-553 mPVRIG -R	TCATGCCAGAGCATACAG
200-571 mPVRIG -F	CAGTGCCTCTAACTGCTGAC
200-572 mPVRIG -R	TCACTGTTACCAGGGAGATGAG
200-549 mPVRIG -F	CACAGGCTGCCCATGCAAC
200-551 mPVRIG –R	TGCCTGGGTGCTAGTGAGAG
200-554 mPVRIG -F	CCACCAACCTCTCGTCTTTC
200-546 mPVRIG -R	GACCCTGTTACCTGTCATTG

Como plantilla para la reacción PCR, se usó ADNc de la línea celular NIH 3T3 o una mezcla de tres paneles de ADNc comerciales:

1. Panel de ADNc I, Ratón, Biochain, Cat nº. C8334501 (Corazón, Cerebro, Riñón, Hígado).
2. Panel de ADNc II, Ratón, Biochain, Cat nº C8334502 (Pulmón, Páncreas, Bajo, Músculo esquelético).
3. ADNc, Clontech, Cat nº 637301 (Cerebro, Corazón, Embrión de 7 días, Testículos, Bajo).

Construcciones de expresión

Se llevó a cabo la clonación de longitud completa y PVRIG-flag humana y de ratón mediante síntesis génica (GenScript) usando una secuencia optimizada con codón en vector pUC57 para tránscrito humano y no optimizada para tránscrito de ratón y subclonada en un vector de expresión de mamífero, pcDNA3.1 o pMSCV, para crear el plásmido de expresión.

La secuencia de PVRIG humana que fue subclonada en pcDNA3.1 se inicia en la segunda metionina de la proteína PVRIG humana, mientras que la secuencia de PVRIG humana que fue subclonada en pMSCV se inicia a partir de la primera metionina de la proteína PVRIG humana.

Construcción que codifica la PVRIG-flag humana.

El gen de PVRIG humana de longitud completa, síntesis mediante GenScript, fue subclonado usando pcDNA3.1 con enzimas de restricción BamI y NheI.

Construcciones que codifican las proteínas PVRIG de ratón:

Se sintetizaron cuatro construcciones que codifican la secuencia de ratón mediante GenScript como:

1. Primera metionina sin etiqueta
2. Primera metionina con etiqueta
3. Segunda metionina sin etiqueta
4. Segunda metionina con etiqueta

El gen sintetizado fue subclonado en pCDNA3.1.

Generación de transfectantes estables que sobre-expresan proteínas PVRIG

La construcción de expresión resultante fue verificada por secuencia y se usó posteriormente para Transfecciones y generación de conjunto estable, como se describe a continuación. Las secuencias de proteína codificadas por las construcciones de expresión son las establecidas en la Figura 103.

Generación de conjuntos transfectantes estables que expresan proteína PVRIG-flag humana.

Las células HEK293 (ATCC, número de catálogo: CRL-1573) fueron transfectadas con plásmido pCDNA3.1+ PVRIG-flag humano o con vector vacío (pCDNA3.1+ como control negativo), usando reactivo FUGENE 6 (Roch, número de catálogo 11-988-387). Se seleccionaron las colonias resistentes a genticina, G418 (Gibco, número de catálogo: 11811-031) para generación de conjuntos estables.

La línea celular de empaquetamiento GP2-293 (Clontech cat. nº 631458) fue transfectada con pMSCV-PVRIG humana o con vector pMSCV vacío usando reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen, número de catálogo 11668019). 48 horas después de la transfección se recolectaron los sobrenadantes que contenían viriones, y se usaron directamente para infección de la línea celular humana como se indica a continuación:

Las células HEK-293 (ATCC, CRL-CRL-1573) fueron infectadas con viriones que expresan PVRIG humana con viriones de vector vacío de pMSCV como control negativo, para la generación de conjuntos estables se seleccionaron colonias resistentes a puromicina (Invivogen, número de catálogo: 58-58-2).

Validación de expresión.

Validación de expresión mediante ensayo de transferencia Western

Se analizaron extractos celulares enteros de conjuntos celulares (30 µg de proteína total) mediante ensayo de transferencia Western. Como control negativo, se usaron extractos celulares enteros de conjuntos celulares estables transfectados con el vector vacío. Para la detección de PVRIG-flag humana, se usaron anticuerpos anti-flag y anti-PVRIG como se indica a continuación:

- M2-peroxidasa anti-Flag de ratón, Sigma, cat. A8592 diluido 1:1000 en TTBS/5% BSA;
- Anti-PVRIG, Sigma cat. HPA047497 – policlonal de conejo, diluido 1:200 en TTBS/5% BSA. Seguido de anti-HRP de conejo de cabra, Jackson, Cat: 111-035-003 diluido 1:20.000 en disolución de 5% leche/TTBS.

Validación de expresión mediante citometría de flujo (FACS)

Con el objetivo de validad la expresión en superficie celular de la proteína PVRIG humana en los conjuntos estables recombinantes, se tiñeron $1x10^5$ células con tinte de viabilidad fijable 450 (BD, 562247) diluido 1:1000 en PBS, durante 10 minutos a R.T. A continuación se añadió a las células anti-PVRIG policlonal de ratón, (Abnova, Cat. H0007903 7-B01) diluido 1:200 o con control de isotipo de IgG1 de ratón (Life Technologies), seguido de tinción con anti-PE de ratón de cabra (Jackson, cat.115-116-146).

Validación de los resultados de expresión de células de conjunto estable HEK293 que sobre-expresan la proteína PVRIG-Flag humana.

Para verificar la expresión de la proteína PVRIG en los conjuntos celulares HEK293 transfectados de forma estable, se analizaron los extractos celulares enteros mediante transferencia Western usando anticuerpo anti-flag o anticuerpos anti-PVRIG (Abnova), tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados, mostrados en la Figura 24, demuestran una banda que corresponde al tamaño de proteína esperado de ~33 kDa en los extractos de conjuntos celulares HEK293 que expresan PVRIG humana, pero no en las células transfectadas con el vector vacío.

A fin de verificar la expresión en superficie celular de la proteína PVRIG humana, se analizaron células HEK293 transfectadas de forma estable que sobre-expresan el vector PVRIG- flag pCDNA3.1 mediante FACS usando pAb anti-PVRIG de ratón (Abnova) como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados presentados en la Figura 25 muestran que la unión de pAb anti-PVRIG de ratón a células que expresan de forma estable PVRIG-flag humana (gris) es mayor que la observada con células transfectadas con el vector vacío (gris claro).

Ejemplo 3: Producción de proteína de fusión PVRIG-ECD Ig

La proteína de fusión PVRIG mECD-mIg (ver la Figura 103), compuesta por el ECD de PVRIG de ratón fusionado con el Fc de IgG2a de ratón, fue producida por ProBioGen (Alemania) en células CHO-DG44 cultivando conjuntos celulares estables durante 12 días, seguido de purificación de proteína A de la cosecha celular y purificación mediante SEC preparativa para eliminación de agregados. El producto final se formuló en Na citrato 5 mM, Na/K fosfato 5 mM, NaCl 140 mM, 0,01% de Tween pH 5,5.

El vector de expresión usado fue el PBG-GPEX6 de ProBioGen. El gen de PVRIG está dirigido por el promotor híbrido CMV/EF1 seguido de la señal de poliadenilación pA-1. El vector contiene gel de N-acetil-transferasa de puromicina que permite la selección de células transfectadas usando puromicina, así como el gen de deshidrofolato reductasa que permite la selección de células transfectadas usando metotrexato (MTX).

La proteína de fusión PVRIG hECD-hIg (ver la Figura 103), compuesta del ECD de PVRIG humana fusionado al Fc de IgG1 humana que porta las mutaciones C220, C226 y C229 a S en la bisagra, fue producido por GenScript (China) mediante transfección transitoria en células CHO-3E7 que fueron cultivadas durante 6 días, seguido de purificación de proteína A de la cosecha celular. El producto final se formuló en PBS, pH 7,2.

El vector de expresión usado fue el vector de expresión de mamífero pTT5, en el que el gen PVRIG está dirigido por el promotor de CMV.

Ejemplo 4: Expresión de PVRIG en PBLs humanas y unión de PVRIG-Fc a líneas celulares de melanoma

PVRIG es una nueva proteína de punto de control inmune, que sin pretender limitarse a una única teoría actúa como receptor de tipo CD28 en las células T. En este estudio, se evaluó la expresión de PVRIG en linfocitos de sangre periférica humana y la unión de PVRIG-ECD-Ig (compuesta por el domino extra-celular de PVRIG humana fusionado a IgG1 humana) a líneas celulares de melanoma.

Materiales y Métodos

Se usaron tres líneas celulares de melanoma humano que presentan el antígeno MART-1 en contexto HLA-A2 (SK-MEL-23, Mel-624 y Mel-624.38) como dianas para CTLs. La Mel-888, que no expresa HLA-A2, sirvió como control negativo.

Se obtuvieron capas leuco-plaquetarias de donantes sanos humanos del “Tel Hashomer Blood Bank”. Las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con PHA y cultivadas durante 3 días, y posteriormente fueron transducidas con un vector retroviral basado en MSCV (pMSGV1). Después de la transducción, las células fueron crecidas adicionalmente en medio de linfocitos (medio Bio target, suero bovino fetal (10%), L-glutamina Penicilina/Estreptomicina (100 unidades/mL), IL-2 300 IU) durante otros 5 días más.

Para evaluar la expresión de PVRIG en PBLs, las células fueron teñidas con un anticuerpo específico para PVRIG (policlonal de ratón) a 5 µg/mL durante 30 minutos a 4 grados. Después del lavado, las células fueron teñidas con mAb anti-ratón de cabra conjugado a FITC (1:250) (Invitrogen, cat. nº A10667) en tampón FACS a oscuras durante 30 minutos a 4 grados. Después de dos lavados en tampón FACS, las muestras fueron leídas en un BD Bioscience FACS Calibur con un Cytek HTS.

Para evaluar la unión de PVRIG-Ig a las líneas celulares de melanoma, se co-cultivaron células SK-MEL-23, Mel-624, Mel-624.38 y mel-888 con PBLs transducidas con F4 o no transducidas (designadas w/o) y posteriormente se tiñeron con 20 µg/mL de la proteína de fusión PVRIG-Ig HH, lote nº125. Después de dos lavados en tampón de FACS, las muestras fueron teñidas con un anticuerpo secundario anti-PE humano de cabra (Jackson, cat nº 109-116-098).

Resultados

Para evaluar la expresión endógena de PVRIG en leucocitos humanos primarios, se estimularon PBLs con PHA y posteriormente se transdujeron con un vector vacío y se tiñeron con un anticuerpo anti-PVRIG específico. Tal como se muestra en la Figura 11, en dos donantes diferentes se observó la tinción con anti-PVRIG respecto a un control de isotipo igualado.

Para evaluar la expresión endógena de PVRIG en líneas celulares de melanoma y para determinar si la expresión endógena se ve afectada por el co-cultivo con células T específicas de antígeno, se co-cultivaron 4 líneas celulares de melanoma diferentes (SK-MEL-23, Mel-624, Mel-624.38 y mel-888) con PBLs que expresan o que no expresan la F4 (TCR específica de gp100). Las células fueron teñidas a continuación con la proteína de fusión compuesta por el dominio extracelular de PVRIG humana fusionado a la porción Fc de la IgG1 humana. Tal como se muestra en la Figura 12, las 4 líneas celulares de melanoma humano exhiben unión a PVRIG-Ig. La intensidad de unión no se ve afectada por la activación dependiente de células T que sigue al co-cultivo con células T modificadas reactivas a melanoma.

Resumen: Los resultados presentados en la presente memoria sugieren que la PVRIG es expresada en leucocitos de sangre periférica (PBLs) primarios humanos activados con PHA. Adicionalmente, las 4 líneas celulares de melanoma que fueron evaluadas en este estudio se unen a la proteína de fusión compuesta por el dominio extracelular de PVRIG humana fusionado a la porción Fc de la IgG1 humana, lo que sugieren que dichas líneas celulares expresan la contrapartida para PVRIG.

Ejemplo 5: Identificación y validación de receptor ligando.

Se llevó a cabo un primer estudio de validación usando una tecnología de microsistema celular usada para cribar por interacciones de PVRIG a 3559 proteínas de membrana de plasma humano de longitud completa, que fueron expresadas individualmente en células HEK293 humanas.

Se crecieron células HEK293 en porta-objetos impregnados con vectores de expresión que codifican 3559 proteínas de membrana humanas de longitud completa. Se impregnó un vector de expresión (pIRES-hEGFR-IRES-ZsGreen1) por cuadruplicado en cada porta-objetos, y se usó para asegurar que se había alcanzado o excedido un umbral mínimo de eficacia de transfección en cada porta-objetos. Las células HEK293 humanas fueron usadas para transfección inversa/expresión. Se añadió una proteína de fusión compuesta por el ECD de PVRIG fusionado a una IgG1 humana a 20 µg/mL a cada porta-objetos después de la fijación celular. Se cribaron dos conjuntos de portas replicados. Las imágenes fluorescentes fueron analizadas y cuantificadas (para determinar la eficacia de transfección) usando el software ImageQuant (GE).

Un “acierto” de proteína se definió como un punto duplicado que muestra un aumento de señal en comparación con los niveles de fondo. Esto se realizó mediante inspección visual usando las imágenes en rejilla con el software ImageQuant. Los aciertos se clasificaron como “fuerte, medio, débil o muy débil”, dependiendo de la intensidad de los puntos duplicados. Para confirmar los aciertos, todos los vectores que codifican los aciertos identificados en el cribado primario fueron dispuestos en nuevos porta-objetos. Se llevó a cabo un cribado de confirmación/especificidad y análisis como en el cribado primario (n=2 portas replicados por muestra), excepto que porta-objetos idénticos también fueron evaluados con los controles negativos apropiados. Adicionalmente, todos los vectores que codifican los aciertos fueron secuenciados. Los vectores que codifican cada acierto primario fueron secuencias confirmando su identidad.

El cribado de fondo mostró una unión desdeñable a células HEK293 no transfectadas a 2, 5 y 20 µg/mL (Figura 13). En base a los datos de fondo, se eligió 20 µg/mL para obtener el perfil completo. El cribado primario dio como resultado múltiples aciertos duplicados (clones), siendo la mayoría de intensidad débil o muy débil. Todos los aciertos primarios identificados, y un vector de control EGFR-ZsGreen1, fueron impregnados y re-expresados por duplicado y sondeados con PVRIG a 20 µg/mL para el cribado de confirmación/especificidad.

Se identificó un acierto específico único, PVRL2, con intensidad fuerte (Figura 14). Otro acierto débil, MAG, se demostró más tarde que se unía también a otras proteínas de fusión evaluadas (datos no mostrados), sugiriendo de este modo que no es específico. Estos resultados son consistentes con el resumen publicado recientemente https://www.yumpu.com/en/document/view/7263720/sunday-december-4-late-abstracts-1-molecular-biology-of-the-/133 de G. Quinones en “New Technologies & Frontiers”. Se conoce que el PVRL2 desempeña un papel como ligando para TIGIT y DNAM1, que son ambos moduladores de la activación de células T y células NK. Recientemente, se ha publicado que TIGIT es un actor clave en la inhibición de la respuesta inmune dirigida contra células tumorales (Noa Stanietsky, *Joumal of Immunology*, vol. 106 nº 42, 17858-17863; Robert J Johnston, *Cancer cell*, Volumen 26, Número 6, p. 923-937, 8 de diciembre de 2014). Los resultados presentados en el Ejemplo 5, que muestran la interacción de la PVRIG con la misma contrapartida que TIGIT, sugieren una implicación de la PVRIG en una importante ruta

reguladora que regula la vigilancia inmunitaria del cáncer, y posicionan por tanto a la PVRIG como diana potencial para el tratamiento del cáncer.

Estudio de validación adicional 2

Materiales y Métodos

Materiales

Proteínas de fusión Fc, proteínas marcadas con His y control de Ig: Se usó la proteína de fusión de Fc PVRIG-Fc M:M para los estudios de unión. Se usó IgG2a de ratón como control de isotipo. Otras proteínas de ratón comerciales usadas en el estudio fueron PVRL2-his (R&D, 3869-N2), y PVRL2-his (Sino Biological, 50318-M08H).

Células: se generaron HEK293 que sobre-expresan (OX) PVRIG de ratón y PVRIG-FLAG (RC-287 y RC-286, respectivamente) y se comparó la unión de PVRL2 a estas células con células HEK293 que expresan vector vacío (EV) (RC-83). Se generaron las variantes de división 1 y 2 (sv1 y sv2) de HEK293 OX PVRL2 de ratón (RC-334 y RC-335, respectivamente) y se comparó la unión de PVRIG a estas células con células HEK293 que expresan EV. También se usaron células B16-F10 (CL-161, células de melanoma de piel de ratón que expresan endógenamente mPVRL2) para estudiar la interacción entre PVRIG y PVRL2.

Anticuerpos: se usó Ab anti-PVRL2-PE de ratón (R&D, FAB3869P, 25 µg/mL, 1:100) para la detección de PVRL2. Se usó IgG2A-PE de rata (R&D, IC006P, 25 µg/mL, 1:100) como control de isotipo. Se usó anti-PE de ratón (Jackson Immunoresearch, 115-115-206, 0,5 mg/mL, 1:200) y Ab anti-his (Abcam, ab72467, 0,1 mg/mL, 1:300) para detectar la unión proteínas recombinantes. Se usó Ab anti-DYKDDDDK Tag (anti-FLAG) (BioLegend, 637302, 0,5 mg/mL, 1:300) para la detección de la expresión de PVRIG en HEK293 OX PVRIG-FLAG de ratón. Para el etiquetado de PVRIG, se usó el kit “Alexa Fluor® 647 Antibody Labeling Kit” (Molecular Probes, A-20186) según el protocolo del fabricante. Para la biotinilación de PVRIG, se usó el kit “DSB-X™ Biotin Protein Labeling Kit” (Molecular Probes, D-20655) según el protocolo del fabricante. La PVRIG biotinilada fue detectada mediante estreptavidina-PE (SA-PE) (Jackson Immunoresearch, 016-110-084, 0,5 mg/mL, 1:300).

Métodos

Análisis FACS de la unión de PVRIG-Fc de ratón a células HEK293 estables que sobre-expresan (OX) PVRL2 de ratón o a células B16-F10: se suspendieron células HEK293 OX PVRL2 (sv1 o sv2) o células B16-F10 en una concentración de 10^6 células/mL en PBS. Por cada 1 mL de células, se añadió 1 µL de disolución de reserva de tinción de viabilidad (BD Horizon Fixable Viability Stain 450, cat. 562247, BD Bioscience). Las células se incubaron durante 10 min protegidas de la luz a temperatura ambiente. A continuación las células fueron lavadas dos veces con PBS y suspendidas a una concentración de $3x10^6$ células/mL en presencia de 1:50 TruStain FcXTM humano (BioLegend 422302) en tampón de FACS (PBS suplementado con un 2% FBS y EDTA 0,5 mM) a temperatura ambiente durante 15 minutos para bloqueo de receptores de Fcγ. Sin lavar, se llevaron a placa a continuación $1x10^5$ células/pocillo en placas de 96 pocillos en forma de V (Costar nº3357). Se examinó la expresión de PVRL2 mediante anticuerpo anti-PVRL2 (ver anterior). Se examinó la unión de PVRIG-Fc a células con diversos lotes (ver anterior), generalmente a 60 µg/mL o con varias concentraciones. Las células fueron incubadas con anticuerpos o PVRIG-Fc durante 40 minutos a temperatura ambiente, a continuación se lavaron una vez. Se añadió anticuerpo secundario (anti-PE de ratón) durante 15 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron dos veces y se tomaron para análisis en analizadores MACSQuant® FACS (Miltenyi Biotec), seguido de análisis de datos usando el software Flow-Jo 10.

Análisis FACS de la unión de PVRL2-his de ratón a células HEK293 estables que sobre-expresan OX PVRIG de ratón: Se examinaron los niveles de PVRIG con anticuerpo anti-FLAG. Se monitorizó la unión de PVRL2-his a anticuerpo anti-his. El análisis FACS se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente.

Análisis SPR biofísico de la interacción PVRIG / PVRL2 mediante Biacore: La interacción entre PVRIG de ratón y PVRL2 se analizó en un analizador de interacción biomolecular Biacore T100 SPR en la Universidad de Bar-Ilan. Las proteínas fueron diluidas a 100 nM en tampón de acetato pH 4,0, y se acoplaron covalentemente a una celda de flujo única de un chip Biacore CM5 Serie S usando química de acoplamiento de aminas estándar. Las superficies fueron activadas con EDC-NHS, y posteriormente se bloquearon mediante inyección de etanolamina 1M (pH 8,5). El tampón de elución fue Hepes 10 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween-20 al 0,05% (HBS-EP+). Los niveles de inmovilización finales fueron de ~1000RU. Las proteínas usadas como analitos fueron diluidas a 2500 nM, 500 nM y 100 nM. En cada experimento un tubo contenía solo tampón de elución a modo de referencia. Después de cada experimento, se llevó a cabo una etapa de regeneración con $MgCl_2$ 4M durante 30 s a 20 µL/s.

Resultados

Unión de PVRIG de ratón a células HEK293 OX PVRL2 sv1: con el objetivo de validar la interacción entre PVRIG de ratón y PVRL2 de ratón, en primer lugar se evaluó la unión de PVRIG-Fc a células que sobre-expresan (OX) PVRL2. El nivel de expresión de PVRL2 en HEK293 OX PVRL2 sv1 se determinó usando anticuerpos anti-PVRL2 de ratón. La expresión de PVRL2 de ratón fue 10 veces superior a la de células HEK293 que expresan vector vacío (datos no mostrados). Se examinaron cuatro lotes de PVRIG-Fc para determinar la unión a células que sobre-expresan PVRL2.

Todos los lotes de PVRIG-Fc mostraron una unión de 6-11 veces a células OX PVRL2 en comparación a la de células de vector vacío (datos no mostrados). También se examinó la unión de PVRIG-Fc a células OX PVRL2 usando proteínas PVRIG biotiniladas y marcadas fluorescentemente (Alexa Fluor 647). Mientras que las proteínas biotiniladas mostraron una unión ligeramente más fuerte a células OX PVRL2 en comparación con la PVRIG-Fc no marcada (datos no mostrados), la PVRIG marcada fluorescentemente demostró una unión mucho menor (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que se detecta PVLR2 sobre la membrana de células HEK293 OX PVRL2; la unión de PVRIG-Fc de ratón a células OX PVLR2 es detectada por anticuerpos anti-IgG2A de ratón; la unión de PVRIG-Fc de ratón biotinilada a células OX PVLR2 es detectada por estreptavidina-PE, y la unión de PVRIG-Fc marcada con Alexa Fluor 647 a células OX PVLR2.

Unión de PVRL2 de ratón a células HEK293 OX PVRIG: para validar adicionalmente la interacción entre PVRIG de ratón y PVRL2 de ratón, se realizó una evaluación de la unión de PVRL2 a células OX PVRIG con o sin una etiqueta FLAG. La expresión en membrana de PVRIG de ratón en células HEK293 OX PVRIG con una etiqueta FLAG se confirmó usando un anticuerpo anti-FLAG (datos no mostrados). Como era de esperar, las células HEK293 OX PVRIG sin una etiqueta FLAG no mostraron expresión usando un anticuerpo anti-FLAG. Usando sobrenadantes anti-PVRIG (Aldeveron), estas células demostraron una menor expresión de PVRIG que las células OX PVRIG con una etiqueta FLAG. La proteína recombinante PVRL2 de ratón comercial solo se encontraba disponible como proteína con etiqueta His. Por lo tanto, fue necesario realizar calibraciones completas para obtener un anticuerpo anti-His apropiado y unas condiciones de detección apropiadas. La PVRL2 marcada con His, de dos fuentes diferentes, fue evaluada en términos de unión a células OX PVRIG a 60 µg/mL, y demostró una unión 2 veces (datos no mostrados) y 3-4 veces (datos no mostrados) superior a la de células HEK293 que expresan vector vacío. Es decir, la PVLR2 de ratón marcada con his se une a HEK293 OX PVRIG de ratón, y la PVRIG de ratón es expresada en membranas de células HEK293 OX PVRIG.

Estudio de la interacción de PVRIG de ratón y PVLR2 de ratón usando SPR-Biacore: Con el objetivo de determinar la interacción entre PVRIG-Fc de ratón y PVRL2 marcada con His de ratón, ambas proteínas fueron inmovilizadas en un chip Biacore. Después de la inmovilización, ambas proteínas, así como PVRIG-Fc (datos no mostrados), fueron sometidas a elución como analitos a tres concentraciones: 2500, 500 y 100 nM (PVRIG lote nº 480 y PVRL2 fueron eluídas dos veces como analitos). Se detectó interacción entre las dos proteínas en ambas direcciones, y con ambos lotes de PVRIG (datos no mostrados). Debido a la cinética compleja, no se pudo determinar una KD exacta a partir de los resultados de Biacore.

Unión de respuesta a dosis de PVRIG de ratón a células HEK293 OX PVRL2 sv2 y a célula B16-F10: Como se ha mostrado anteriormente, la unión de PVRL2 de ratón a células OX PVRIG de ratón fue relativamente baja. A fin de establecer un método para cribar anticuerpos anti-PVRIG de ratón capaces de bloquear la interacción entre PVRIG de ratón y PVRL2 de ratón, se seleccionó la unión de PVRIG-Fc a células OX PVRL2. En primer lugar, se generó una curva de unión de respuesta a dosis de IgG2A de ratón y PVRIG-Fc de ratón a células OX PVRL2 de ratón y se comparó con las células que expresan vector vacío (EV). La respuesta a dosis se realizó con diluciones en serie a la mitad (1:2) desde 50 µg/mL a 0,1 µg/mL. Aunque no se observó diferencia en la unión de IgG2A de ratón (datos no mostrados), la PVRIG-Fc demostró una saturación de la unión a 12,5 µg/mL y una unión reducida en correlación con la disminución de la concentración de proteína (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares también con PVRIG-Fc (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el ensayo de unión puede considerarse para cribar anticuerpos bloqueantes.

Con el objetivo de considerar también un sistema endógeno para cribar anticuerpos anti-PVRIG de ratón, se determinó la expresión de PVRL2 en células B16-F10 usando un anticuerpo anti-PVRL2. Los resultados demuestran que PVRL2 se expresa de forma elevada en células B16-F10 (datos no mostrados). Por lo tanto, se produjo una curva dosis respuesta de unión similar también para la unión de IgG2A de ratón y PVRIG-Fc de ratón a células B16-F10. De forma similar a los resultados obtenidos con células HEK293 OX PVRL2, la PVRIG-Fc de ratón demostró una dosis respuesta de unión a células B16-F10 que alcanzaba saturación a 12,5 µg/mL, aunque no se detectaron cambios en la unión de IgG2A de ratón (datos no mostrados).

Discusión y conclusiones: se identificó la interacción de PVRIG humana con PVRL2 humana usando Tecnología de Microsistemas Celulares en Retrogenix. Para validar esta interacción también en ratón, se adoptaron varias estrategias. Entre ellas, el uso de células OX PVRIG o PVRL2, y medidas biofísicas usando SPR-Biacore. Todas las estrategias indicaron que la PVRIG de ratón interacciona con PVRL2 de ratón. Sin embargo, la unión de PVRL2 de ratón a células OX PVRIG fue relativamente baja en comparación con la unión de PVRIG a células OX PVRL2. La razón para ello podría ser el hecho de que la PVRL2 comercial solo está disponible como monómero de proteína marcada con His y no como proteína fusionada a Fc (como en el caso de la PVRIG). Para este fin, se produjo una PVRL2 de ratón fusionada a Fc en GenScript. Sin embargo, a partir de datos preliminares, solo se observó un pequeño aumento en la unión con esta proteína (de ~5 veces comparado con 2-3 veces para la PVRL2-his). Por lo tanto, algunos otros factores podrían influir en dicha unión relativamente baja.

Debido a la baja unión de PVRL2 a células OX PVRIG, se decidió establecer un ensayo de bloqueo de anticuerpos anti-PVRIG usando la unión de PVRIG-Fc a células OX PVRL2. Según las curas de dosis respuesta observadas, se sugirieron tres concentraciones de trabajo: 0,1, 0,2 y 0,4 µg/mL. Siguiendo resultados similares obtenidos con la unión

de PVRIG a células B16-F10 que expresan endógenamente PVRL2, se sugirió llevar a cabo el ensayo de bloqueo de anticuerpos también con estas células a las siguientes concentraciones: 0,2, 0,4, 0,8 µg/mL.

Se presume que PVRIG es un receptor, por tanto, preferiblemente el ensayo de bloqueo de anticuerpos debería llevarse a cabo con PVRL2 como proteína soluble y PVRIG expresada en las células. Por tanto, debería considerarse examinar anticuerpos anti-PVIRG de ratón que demuestran actividad de bloqueo en el presente formato también en este sistema.

Estudio de validación adicional 3

El objetivo de este estudio es confirmar las parejas de unión de PVRIG, una nueva diana inmuno-oncológica. Los estudios preliminares indican que uno de estos ligandos es la PVRL2. En este estudio, se ha investigado la unión de la proteína recombinante PVRIG a varios ligandos potenciales del eje de PVRIG mediante ELISA.

Protocolos

Lista de reactivos: la bibliografía actual sobre proteínas PVRIG sugiere que existen tres ligandos potenciales: PVR (CD155), PVRL2 (CD112), y PVRL3 (CD113). Para investigar su capacidad para unirse al receptor de PVRIG, se buscaron estos tres ligandos comercialmente, como se indica a continuación: PVR y PVRL3 de Sino Biologicals Inc. y PVRL2 de R&D Systems y Sino Biologicals Inc. La proteína recombinante PVRIG humana fue generada en Compugen como el dominio extra-celular (ECD) de PVRIG fusionado a dominio Fc de IgG1 humana (PVRIGHH).

ELISA para determinar la interacción receptor-ligando: Los ligandos obtenidos comercialmente marcados con His, PVR, PVRL2 y PVRL3, fueron recubiertos sobre los pocillos de una placa de alta unión EIA/RIA (Costar 9018) durante una noche a 4ºC. Se incluyó una proteína marcada con His irrelevante como control negativo. Los pocillos de placa recubiertos fueron lavados dos veces con PBS y se incubaron con 300 µL de tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente (RT) durante 1 h. Se retiró el tampón de bloqueo y las placas fueron lavadas dos veces más con PBS. Los ligandos unidos a placa fueron incubados con concentraciones variables de PVRIGHH en disolución (rango lineal de 0,1 µg/mL a 4 µg/mL en un volumen de pocillo de 50 µL) a RT durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T (PBS 7,4, 0,05% de Tween20), a continuación tres veces con PBS y se añadieron 50 µL/pocillo de un anticuerpo secundario conjugado a HRP (dominio específico Fc de IgG humana, Jackson ImmunoResearch). Se incubó a RT durante 1 h y las placas se volvieron a lavar. Se desarrollaron las señales ELISA en todos los pocillos añadiendo 50 µL de sustrato Sureblue TMB (KPL Inc) e incubando durante 5-20 minutos. La reacción de HRP de detuvo añadiendo 50 µL de H_2SO_4 2N (VWR) y se leyeron las señales de absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices) o EnVision (PerkinElmer). Los datos fueron exportados a Excel (Microsoft) y se representaron en GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Resultados: la PVRIG se une preferiblemente a PVRL2: la proteína de fusión PVRIG Fc humana fue evaluada para determinar la unión a PVR, PVRL2 y PVRL3, que fueron inmovilizados en una placa EIA/RIA. Se incubaron concentraciones variables de PVRIG receptor en fase de disolución con el ligando inmovilizado. Los datos muestran claramente una unión dependiente de dosis de PVRIGHH a PVRL2, pero no unión a los ligandos PVR, PVRL3 o la proteína de control negativo (datos no mostrados). La señal ELISA A450 se representó en función de la concentración de receptor usando una ecuación de unión a un sitio, revelando una constante de equilibrio de unión (KD) de 13 ± 1 nM.

Resumen y Conclusiones: La PVRIG es una nueva diana inmuno-oncológica de la cual aún no se entiende completamente la biología. En un esfuerzo para arrojar luz sobre dicha biología, se ha examinado la unión a varios ligandos potenciales. PVRL2 ha sido identificada claramente como la pareja de unión de PVRIG. El análisis cuantitativo sugiere que dicha interacción es muy fuerte, con una KD de 13 ± 1 nM. Nuestros resultados también sugieren que la PVRIG humana no se une a PVR y PVRL3 humanas, o la unión es demasiado débil para ser detectada mediante ELISA.

Estudio de validación adicional 4:

En este ejemplo, se evaluó la expresión de PVRIG en subconjuntos de células PBMC pre y post alo-activación. Después de la alo-activación, la expresión de PVRIG se vio regulada al alza en células T CD4+ y en células T CD8+ y en células T gamma delta negativas. Dicha regulación al alza se observó en PBMCs de uno de los dos donantes evaluados (véase la Figura 52).

Ejemplo 6: 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 llevaron a cabo usando un instrumento ProteOn XPR 36 a 22ºC.

Etapa 1: Se preparó una superficie de anticuerpo policlonal anti-Fc humano de cabra de alta densidad (Invitrogen H10500) en las seis calles de un chip GLC usando un biosensor ProteOn XPR 36. La etapa de activación para la

superficie de anti-Fc humano se produjo en la dirección de flujo horizontal, mientras que la etapa de inmovilización para el pAb de alta densidad se produjo en la dirección de flujo vertical. La etapa de bloqueo se produjo tanto en la posición vertical como en la horizontal, de tal modo que las "inter-señales" podía usarse como superficies de referencia. Se inmovilizó un promedio de ~4400 RU de pAb anti-humano de cabra en cada calle.

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

Etapa 3: Los datos de sensograma de la unión de analitos a cada ligando capturado fueron procesados y referenciados doblemente usando ProteOn Manager versión 3.1.0.6, haciendo uso de referencia inter-señal y una inyección pre-blanco idéntica a las inyecciones de analito.

Resultados

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

b) PVRLR2: Ambos lotes de PVRL2 mostraron unión a los tres lotes de PVRIG y DNAM-1 pero una unión mínima o nula a TIGIT, y ninguna unión al control de IgG. Los sensogramas mostraron cinéticas complejas, por tanto no se pudo estimar las constantes de unión (datos no mostrados).

c) PVRL3: Mostró unión mínima a TIGIT y no se unió a las otras proteínas (datos no mostradas).

Ejemplo 7: Actividades *in vitro* inmunomoduladoras de PVRIG ECD-Ig en células T de ratón

En estos experimentos se investigaron las actividades inmunomoduladoras de la proteína fusionada recombinante PVRIG-ECD-Ig en la activación de células T de ratón. Se investigó el efecto de PVRIG-ECD-Ig en la activación de células T CD4 de ratón usando una serie de lecturas de activación de células T *in vitro*: marcadores de activación celular, secreción y proliferación de citoquinas.

Para evaluar la actividad de la proteína PVRIG en la activación de células T, se produjo proteína recombinante que comprende el dominio extracelular (ecd) de ratón de la PVRIG de ratón fusionada a fc de igg2a de ratón (designada PVRIG-ECD Ig M:M) (SEQ ID NO: 29). Se investigó el efecto de la proteína fusionada a fc co-inmovilizada con anti-cd3 sobre las funciones de las células t cd4 de ratón, manifestado a través de marcadores de activación y secreción de citoquinas.

Materiales y Métodos

Se evaluó la proteína de fusión de Fc y la proteína de fusión de control Ig : Fc, PVRIG-ECD-Ig (lote nº 198). Como control de isotipo se usó IgG2a de ratón (clon MOPC-173; Biolegend o C1.18.4; BioXcell).

Aislamiento de células T CD4 de ratón: Se aislaron células T CD4+CD25- intactas de conjuntos de bazos de ratones BALB/C usando un kit de aislamiento de células T (Miltenyi Cat nº 130-093-227) según las instrucciones del fabricante. La pureza obtenida fue de >90%.

Activación de células T CD4 de ratón: mAb anti-CD3-ε de ratón (clon 145-2C11; BD Biosciencies) a 2 µg/mL junto con proteína PVRIG-ECD-Ig o Ig de control a diversas concentraciones (1, 3, o 10 µg/mL), se co-inmovilizaron durante 3 h a 37ºC en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Sigma, cat nº Z707910). Se añadió Ig de control a cada pocillo para completar una concentración total de proteína de 12 µg/mL por pocillo. Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS y llevados a placa con $1x10^5$ células T CD4+CD25- purificadas por pocillo, y se mantuvieron en un incubador humidificado, con un 5% de CO_2, a 37ºC. En algunos experimentos, se añadió anti-CD28 soluble (clon: 37.51; eBioscience; 1 µg/mL). Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados a los tiempos indicados post-estimulación y analizados para secreción de IFNγ o IL-2 de ratón mediante kits ELISA (R&D Systems). Se analizó el efecto de la proteína PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103) sobre la expresión del marcador de activación CD69 en células T CD4+ de ratón mediante citometría de flujo. Las células fueron teñidas 48h post estimulación con un cóctel de anticuerpos que incluye PerCP-anti-CD4 (clon G41.5; Biolegend), FITC o PE-anti-CD69 (clon H1.2F3; Biolegend), en presencia de anti-CD16/32 (clon 2.4g2; BD Biosciences) para bloqueo de receptores Fcγ. Las células fueron evaluadas usando el

analizador 9 de MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron usando el software BD CellQuest o MACSQuantify TM. Los datos se analizaron usando Excel o el software Prism4.

Resultados y Resumen

Efecto de PVRIG-ECD Ig M:M (ver Figura 103) en la función de células T CD4+: la Figura 15 muestra las actividades inmunomoduladoras in vitro de PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103) en células T esplénicas de ratón aisladas (CD4+, >95% de pureza) estimuladas con microplacas co-inmovilizadas con anti-CD3 (2 µg/mL) solo o co-inmovilizado con Ig de control (mIgG2a) o PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103)) (10 µg/mL) en presencia de anti-CD28 soluble (1 µg/mL). La PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103) suprimió la activación de células T CD4 de ratón de un modo dependiente de la dosis, como manifiesta la reducción de la regulación al alza de CD69 (Figura 15A, D), y la reducción de la secreción de citoquinas inducidas por TCR (IL-2 e IFNγ) (Figura 15B-C, E). La magnitud del efecto inhibidor de la PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103) estuvo en el rango de 30-100%. El efecto inhibidor de la PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103) sobre la secreción de IFNγ se observó en concentraciones tan bajas como 3 µg/mL (~60% de inhibición frente al control de Ig).

La PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103) inhibe la activación de células T de un modo dependiente de la concentración cuando la proteína de fusión Fc es co-inmovilizada con anti-CD3 en placas. El efecto inhibidor máximo se observó a 10 µg/mL de PVRIG-ECD-Ig (ver la Figura 103).

Los resultados demuestran el efecto inhibidor de PVRIG-ECD-Ig en la activación de células T de ratón, manifestado a través de una reducción de la secreción de citoquinas, y de la supresión de la regulación al alza del marcador de activación CD69. Esta inhibición de la activación de células T apoya el potencial terapéutico de las proteínas PVRIG inmunomoduladoras (polipéptidos de PVRIG y proteínas de fusión) según la presente invención en el tratamiento de enfermedades autoinmunes dirigidas por células T, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, soriasis y enfermedad inflamatoria del intestino, así como otras enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y/o para reducir la activación no deseada del sistema inmune tras una terapia génica. Adicionalmente, estos resultados también apoyan el potencial terapéutico de las proteínas PVRIG inmunoestimuladoras (polipéptidos de PVRIG y proteínas de fusión) que reducen la actividad inhibidora de PVRIG para tratar afecciones que se beneficiarían de unas mayores respuestas inmunes, en particular una mayor inmunidad de CTL y de citoquinas pro-inflamatorias tales como cáncer, enfermedades infecciosas, particularmente infecciones crónicas y sepsis, donde el agotamiento mediado por células T de las células enfermas sea terapéuticamente ventajoso.

Ejemplo 8: Actividades inmunomoduladoras in vitro de PVRIG en células T citotóxicas (CTLs) humanas

Los experimentos descritos en este ejemplo evaluaron el efecto de la expresión ectópica de PVRIG humana en diferentes líneas celulares de melanoma sobre su capacidad para activar CTLs (linfocitos T citotóxicos) y actuar como dianas para ser matadas por dichas células.

Materiales y Métodos:

Se usaron tres líneas celulares de melanoma humano que presenta el antígeno MART-1 en el contexto de HLA-A2 (SK-MEL-23, Mel-624 y Mel-624.38) como dianas para CTLs. Mel-888, que no expresa HLA-A2, sirvió como control negativo.

Expresión ectópica de PVRIG humana en linfocitos T citotóxicos (CTLs): Para expresar PVRIG humana en cultivos de leucocitos de sangre periférica (PBL), se amplificó el ADNc que codifica para PVRIG usando cebadores específicos y se clonó en un vector retroviral basado en MSCV (pMSGV1) o en vectores tripartitos: las cadenas - y - de TCR F4 dependiente de CD8 fueron ligadas con una secuencia P2A y clonadas en el vector pMSGV1, tanto seguidas por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) como por PVRIG. El vector retroviral que codifica para NGFR1, como control negativo o en vectores triplicados: las cadenas - y – de TCR F4 dependiente de CD8 fueron ligadas con una secuencia P2A y clonadas en el vector pMSGV1, tanto seguidas por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) como por NGFR. La verificación de la clonación se realizó primero usando digestión de enzima de restricción y posteriormente mediante secuenciamiento. Tras confirmación de secuencia, se produjeron grandes cantidades del vector retroviral (Maxi-prep) para el uso posterior.

Se transdujeron leucocitos de sangre periférica de donantes humanos sanos con las construcciones retrovirales que codifican PVRIG o con los vectores retrovirales que codifican para NGFR1 o un vector vacío, como control negativo. La transducción se llevó a cabo usando un protocolo basado en retronectina; resumidamente, se produjo sobrenadante retroviral en células 293GP (una línea celular de empaquetamiento retroviral) después de transfección con el vector retroviral y un gen de envoltura anfotrópico (VSV-G). El sobrenadante retroviral se llevó a placa sobre placas recubiertas de retronectina antes de la transducción para permitir la unión de viriones a la placa, y los PBLs se añadieron a la placa durante 6 horas. Después de eso, las células fueron restauradas en un nuevo recipiente de cultivo Se determinó la eficacia de transducción y la expresión de la proteína mediante tinción de los PBLs transducidos con anticuerpo policlonal de conejo específico de PVRIG o con anti-NGFR comercial (cat nº 345108; BioLegend). Como control de isotipo se usó IgG de conejo (Sigma cat nº I5006), y como anticuerpo secundario se usó IgG anti-conejo conjugada a APC (Jackson, cat nº 711-136-152).

Expresión ectópica del receptor de células T F4 en linfocitos T citotóxicos (CTLs): Para obtener linfocitos efectores que expresan el TCR F4 específico de MART-1, que reconoce específicamente el complejo MART-126-35-/HLA-A2 péptido-MHC, PBLs humanas recién aisladas transducidas previamente para expresar con PVRIG, NGFR o un vector vacío, fueron estimuladas con PHA y cultivadas durante 5-10 días, y posteriormente fueron transducidas con ARNm transcrito *in vitro* que codifica cadenas α y β de TCR de F4 específico de MART-1. Los linfocitos transducidos fueron cultivados en medio de linfocitos (medio diana Bio, suero fetal bovino (10%), L-glutamina penicilina/ Estreptomicina (100 unidades/mL), IL-2 300 IU), regenerado cada 2-3 días. Se verificaron los niveles de expresión de TCR de F4 mediante tinción FACS usando un anticuerpo monoclonal específico que reconoce el dominio extra-celular de la cadena beta del TCR específico transducido. (TCR-Vb12-PE, (Cat. Nº IM2291; Beckman Coulter).

Secreción de citoquinas de linfocitos transducidos con PVRIG, NGFR o un vector vacío y F4-TCR tras co-cultivo con células de melanoma: Se co-cultivaron PBLs que expresan PVRIG o NGFR junto con F4-TCR con células de melanoma no manipuladas. Se co-cultivaron 10^5 PBLs transducidos con 10^5 células diana de melanoma durante 16 horas. A fin de determinar la respuesta de las células T CD8 efectoras a las diferentes líneas celulares tumorales, se midió la secreción de citoquinas (IFNγ, IL-2 y TNF-α) mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo (IFNγ (Cat. nº DY285E), IL-2 (Cat. Nº DY202E), TNF-α (Cat. Nº DY210E) R&D SYSTEMS), diluidos para entrar en el rango lineal del ensayo ELISA.

Ensayo de citotoxicidad mediado por células: Este ensayo se llevó a cabo para determinar la muerte de células diana en co-cultivo. Se expresaron PVRIG y F4 en PBLs usando un vector bi-cistrónico y se co-cultivaron con células diana de melanoma marcadas con CFSE (marcadas con CFSE 2 mM (eBioscience) durante 6 minutos), a 37ºC durante 18h, a una relación E:T de 3:1. Las células fueron recolectadas después de 18h y se añadió yoduro de propidio 1 mM (Sigma-Aldrich) para asignar la ratio de muerte celular. Las muestras fueron eluídas en un citómetro de flujo CyAn-ADP (Beckman Coulter).

Resultados:

Diseño general del sistema experimental: En el sistema experimental descrito en la presente memoria, se sobre-expresa PVRIG en PBLs humanas que a continuación son manipuladas para expresar el F4-TCR específico de MART1 y restringido por HLA-A2. A continuación las células sobre-expresadoras son co-cultivadas con líneas celulares de melanoma (referencia) HLA-A2 positivas (nombrarlas) y HLA-A2 negativas (nombres). El F4-TCR ha sido usado recientemente en ensayos clínicos en pacientes de melanoma terminales para conferir específicamente reconocimiento tumoral por linfocitos autólogos de sangre periférica usando un retrovirus que codifica el TCR (Morgan et al, 2006 Science, 314:126-129). Se determinó el efecto de la expresión de PVRIG en la activación específica de antígeno de células T CD8 mediante co-cultivo con células de melanoma cognadas a través de la secreción de citoquinas.

Sobre expresión de PVRIG en PBLs humanos – experimento 1: Se transdujeron PBLs humanos con un vector retroviral que codifica la PVRIG o un vector vacío como control negativo, tal como se describe en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de PVRIG mediante citometría de flujo 48 h después de la transducción, y se compararon con las células transducidas con un vector vacío. El porcentaje de células que expresan transgén fue del 62,4%, como se muestra en la Figura 16.

Sobre expresión de PVRIG en PBLs humanos – experimento 2: Se transdujeron PBLs humanos con un vector retroviral que codifica PVRIG o NGFR o un vector vacío como controles negativos, tal como se describe en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de PVRIG mediante citometría de flujo 48 h después de la transducción, y se compararon con células transducidas con un vector vacío. El porcentaje de células que expresan PVRIG estaba en el rango del 20%. La expresión de NGFR fue del 63%, tal como se muestra en la Figura 17. Algunos intentos adicionales de sobre expresar PVRIG en PBLs no tuvieron éxito. Una posibilidad es que la dificultad para expresar PVRIG en PBLs primarios surge de un nivel de expresión endógena basal en estas células.

Sobre expresión de F4 TCR en PBLs humanos: Para llevar a cabo ensayos funcionales con CTLs humanos, usamos PBLs modificados para expresar el F4 TCR, que reconoce células de melanoma HLA-A2+/MART1+, como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 18A muestra los niveles de expresión de F4 TCR obtenidos tras transducción de TCR de los leucocitos usados en el experimento 1, la Figura 18B muestra los niveles de expresión de F4 TCR obtenidos tras transducción de TCR de los leucocitos usados en el experimento 2.

Efecto de la expresión de PVRIG sobre la secreción de IFNγ – experimento 1: Se co-cultivaron PVRIG o vector vacío y PBLs transducidas con F4 con líneas celulares de melanoma. Se midieron los niveles de secreción de IFNγ a las 16 h de co-cultivo. Tal como se muestra en la Figura 19, la magnitud de la inhibición de la secreción de IFNγ debida a sobre-expresión de PVRIG fue superior al 90%. El co-cultivo con la línea celular HLA-A2 negativa Mel-888 que sirvió como control negativo, produjo solo una secreción menor de IFNγ dependiente de activación a partir de linfocitos transducidos con F4. Los PBLs que no expresan el F4 TCR (designados W/O) sirven como control negativo adicional.

Efecto de la expresión de PVRIG sobre la secreción de IFNγ – experimento 2: PVRIG, NGFR o vector vacío y F4 fueron transducidos en PBLs en co-transducción (Figura 20A) o usando un vector bi-cistrónico (Figura 20B). Los PBLs transducidos fueron co-cultivados con líneas celulares de melanoma. Se midieron los niveles de secreción de IFNγ a

las 16 h de co-cultivo. Tal como se muestra en la Figura 20A, la magnitud de la inhibición de la secreción de citoquinas debida a sobre-expresión de PVRIG estuvo en el rango del 30%. El co-cultivo con la línea celular HLA-A2 negativa Mel-888 que sirvió como control negativo, produjo solo una secreción menor de IFNγ dependiente de activación a partir de linfocitos transducidos con F4. Los PBLs que no expresan el F4 TCR (designados W/O) sirven como control negativo adicional. Tal como se muestra en la Figura 20B, cuando se co-transduce PVRIG con el F4 TCR, no se observó inhibición de IFNγ.

Efecto de PVRIG en la actividad mortal mediada por CTL – experimento 2: PVRIG o NGFR y F4 fueron transducidos a PBLs usando un vector bi-cistrónico y se co-cultivaron con líneas celulares de melanoma marcadas con CFSE. Tal como se muestra en la Figura 21, el porcentaje de eventos positivos en yoduro de propidio (que refleja la intensidad de la actividad mortal) disminuyó en ~50% por la expresión de PVRIG con respecto a las células transducidas con NGFR del control negativo. La actividad mortal de las células que expresan PVRIG es similar a la del co-cultivo entre melanoma y PBLs que no expresan el F4 TCR (designados W/O).

Resumen: sin pretender estar limitados por una única hipótesis, los resultados presentados en la presente memoria indican que la sobre-expresión en linfocitos primarios da como resultado una reducción de la secreción de citoquinas por parte de CTLs, lo que sugiere que la PVRIG tiene un efecto inhibidor sobre los CTLs.

Ejemplo 9: Anticuerpos anti-PVRIG humana

El objetivo de este estudio fue aislar anticuerpos humanos que se unen a la diana inmuno-oncológica PVRIG con alta afinidad y especificidad, y bloquear la interacción de PVRIG con su pareja de unión, PVRL2. Esto se logró preparando una biblioteca de presentación de fagos de fragmento fab contra una proteína recombinante que comprende el dominio extracelular (ECD) de PVRIG humana fusionado a la región Fc de IgG1 humana, y cribando los anticuerpos resultantes en función de su capacidad para bloquear la interacción de PVRIG con PVRL2.

Protocolos

QC funcional de reactivos: La pureza del agente de preparación, ECD de PVRIG fusionado a dominio Fc de IgG1 humana (PVRIGHH), fue determinada mediante Electroforesis Capilar de Microfluidos usando un Sistema LabChip (PerkinElmer). La actividad del reactivo de preparación fue validada por su capacidad para unirse a su ligando PVRL2.

ELISA para detectar la interacción proteína-proteína: Se diluyó proteína recombinante PVRL2 marcada con His a 2 µg/mL en salino tamponado con fosfato (PBS) y se recubrieron alícuotas de 50 µL sobre los pocillos de una placa de alta unión EIA/RIA (Costar) durante una noche a 4ºC. Los pocillos de la placa recubierta fueron lavados dos veces con PBS e incubados con 300 µL de tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente (RT) durante 1 h. Se eliminó el tampón de bloqueo y las placas fueron lavadas dos veces más con PBS. Se incubó PVRL2 ligada a placa con concentraciones variables de PVRIGHH en disolución (rango lineal de 0,1 µg/mL a 4 µg/mL en un volumen de 50 µL/pocillo) a RT durante 1 h. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS-T (PBS 7,4, 0,05% de Tween20), a continuación tres veces con PBS y se añadieron 50 µL/pocillo de un anticuerpo secundario conjugado a HRP (específico de dominio Fc de IgG humana). Se incubó a RT durante 1 h y se volvió a lavar las placas. Se desarrollaron las señales ELISA en todos los pocillos añadiendo 50 µL de sustrato Sureblue TMB (KPL Inc) e incubando durante 5-20 minutos. La reacción de HRP se detuvo añadiendo 50 µL de H_2SO_4 2N (VWR) y se midieron las señales de absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices) o EnVision (PerkinElmer).

Preparación de PVRIG biotinilada: Para facilitar la preparación de fagos en disolución usando perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, PVRIGHH y un control de isotipo Fc de IgG1 humana irrelevante fueron biotinilados usando el kit “Lightning-Link® Biotin Kit” (Innova Biosciences). Las reacciones de biotinilación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del fabricante y los reactivos biotinilados se almacenaron a 4ºC para QC adicional y preparación. La pureza y la actividad de las proteínas marcadas con biotina se determinó mediante LabChip y ELISA funcional, como se describe en la Sección 2.1. Adicionalmente, se determinó el grado de biotinilación mediante ELISA usando dos estrategias: 1) los reactivos biotinilados fueron adsorbidos en una placa de EIA/RIA de alta unión y las proteínas fueron detectadas usando estreptavidina conjugada a HRP, y 2) las proteínas biotiniladas fueron incubadas en placa EIA/RIA pre-recubierta con estreptavidina y la unión se detectó usando un anticuerpo secundario específico de dominio Fc de IgG humana conjugada a HRP.

Preparación de fagos de biblioteca de anticuerpos humanos: Las reacciones de preparación se llevaron a cabo en disolución usando perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina para captura los antígenos biotinilados. Cabe destacar que todas las etapas de lavado y elución se llevaron a cabo usando un sistema magnético para capturar las perlas (Promega). Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente con mezcla suave en un rotador de tubos (BioExpress). Se llevaron a cabo cuatro sub-campañas de preparación, cada una con una combinación diferente de concentraciones de antígeno, lavados y etapas de agotamiento de ligando de Fc (Tabla 1).

Todas las sub-campañas de preparación se llevaron a cabo usando el antígeno PVRIGHH biotinilado. Para cada ronda de preparación, las bibliotecas de fagos fueron agotadas contra 100 pmol de proteína Fc de IgG1 humana irrelevante en dos etapas sucesivas. Tras el agotamiento, las sub-campañas A y B implicaron la preparación contra 50 nM del

antígeno en cada ronda, en condiciones de lavado de baja y alta severidad, respectivamente. Las sub-campañas C y D fueron idénticas a la sub-campaña B, excepto que en la campaña C la biblioteca fue bloqueada con un exceso 10 a 1 de la proteína Fc de IgG1 irrelevante en las rondas de preparación 2 y 3. La sub-campaña D difirió en que se usó 5 nM de antígeno en la ronda 3.

Tabla 1: Antígeno y condiciones de lavado usados para la preparación de fagos contra PVRIGHH.

Sub-campaña	Ronda	Conc. de antígeno	Lavados	Agotamiento Fc
A	1	50 nM	3x PBS-T + 3x PBS	2X 100 pmol
	2	50 nM	3x PBS-T + 3x PBS	2X 100 pmol
	3	50 nM	3x PBS-T + 3x PBS	2X 100 pmol
B	1	50 nM	3x PBS-T + 3x PBS	2X 100 pmol
	2	50 nM	6x PBS-T + 6x PBS	2X 100 pmol
	3	50 nM	6x PBS-T + 6x PBS	2X 100 pmol
C	1	50 nM	3x PBS-T + 3x PBS	2X 100 pmol
	2	50 nM	6x PBS-T + 6x PBS	2X 100 pmol + bloqueo con 1 nmol
	3	50 nM	6x PBS-T + 6x PBS	2X 100 pmol + bloqueo con 1 nmol
D	1	50 nM	3x PBS-T + 3x PBS	2X 100 pmol
	2	50 nM	6x PBS-T + 6x PBS	2X 100 pmol
	3	5 nM	6x PBS-T + 6x PBS	2X 100 pmol

2.4 Preparación de biblioteca de fagos para preparación: todos los experimentos de preparación de fagos usaron la biblioteca de presentación de fagos de anticuerpo fab humano XOMA031 (XOMA Corporation, Berkeley, CA). Se bloqueó suficiente fago para una sobre-representación de 50 a 1 de la biblioteca mezclando 1:1 con 10% de leche desnatada en polvo en PBS (concentración final de leche desnatada 5%) e incubando durante 1 h.

2.4.1 Acoplamiento de antígeno a perlas de estreptavidina: para cada sub-campaña, se bloquearon tres alícuotas de 100 µL de perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina Dynal (Life Technologies) mediante suspensión de 1 mL de tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en PBS) y se incubó durante 30 minutos. Una alícuota de perlas bloqueada se mezcló con 100 pmoles de PVRIGHH biotinilada. Las otras dos alícuotas se mezclaron con 100 pmoles del antígeno irrelevante para agotamiento de ligando solo de Fc. Los antígenos marcados con biotina fueron acoplados a las perlas durante 30 minutos a RT. Las suspensiones de perlas fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar el antígeno libre y se re-suspendieron en 100 µL de tampón de bloqueo.

2.4.2. Agotamiento de Fc de IgG1 humana y ligandos de perlas de estreptavidina de la biblioteca de fagos: fue necesario eliminar los ligandos no deseados de perlas de estreptavidina y de la región Fc de PVRIGHH antes de que pudiera comenzar la preparación de fagos. Para lograr esto, el fago bloqueado se mezcló con una alícuota de 100 µL de perlas de estreptavidina no acopladas y se incubó durante 45 minutos. Las perlas (y presumiblemente las perlas no deseadas y los ligandos de Fc de IgG1 humana) fueron desechados. Esta etapa se repitió una vez y los sobrenadantes de la biblioteca de fagos agotados se reservaron para la preparación.

2.5 Preparación de fagos ronda 1: la biblioteca de fagos bloqueada y agotada se mezcló con PVRIGHH biotinilada acoplada a perlas magnéticas como se ha descrito anteriormente. Esta suspensión se incubó durante 1 h a RT con una rotación suave para permitir la unión de fago específico de PVRIGHH. Los ligandos no específicos fueron eliminados mediante lavado según el protocolo de la Tabla 1. Tras lavar, los fagos ligados fueron eluídos mediante incubación con 500 µL de trietilamina (TEA) 100 mM (EMD) durante 15 minutos a RT. El eluato se neutralizó añadiendo 500 µL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Teknova).

2.5.1. Determinación del título de fagos: 10 µL de la biblioteca de fagos inicial (título de entrada) o de eluato de preparación (título de salida) fueron diluidos en serie (10 veces) en PBS. Se mezcló una alícuota de 90 µL de cada dilución de fago con 500 µL de células *E. coli* TG1 crecidas hasta una densidad óptica de ~0,5 a 600 nm (DO 600nm). Se dejó que los fagos infectaran las células mediante incubación estacionaria durante 30 minutos, después con incubación en agitación (250 rpm) durante 30 minutos, todo a 37ºC. Se impregnó una alícuota de 10 µL de cada cultivo celular infectado en una placa de agar 2YT suplementada con un 2% de glucosa y 100 µg/mL de carbenicilina (2YTCG, Teknova). Las placas fueron incubadas durante una noche a 30ºC. Se contabilizaron las colonias que crecieron de cada impregnación de 10 µL y se usaron para calcular los títulos de entrada y de salida.

2.5.2. Rescate de fagos: El eluato de fagos remanente (~1 mL) se mezcló con 10 mL de células *E. coli* TG1 crecidas hasta una DO 600 nm de 0,5. Los fagos fueron infectados en células como se detalla en la sección 2.5.1. Las células infectadas fueron peletizadas mediante centrifugación a 2500xG, resuspendidas en 750 µL de medio 2YT (Teknova) y extendidas en placas de agar 2YTCG. Éstas fueron incubadas durante una noche a 37ºC y las colonias de E. coli

resultantes fueron rascadas y resuspendidas en ~20 mL de 2YTCG líquido (Teknova). Se inoculó una pequeña alícuota de células re-suspendidas en 50 mL de 2YTCG para alcanzar una DO 600nm de 0,05, y a continuación se crecieron a 37ºC con agitación a 250 rpm hasta que la DO alcanzó un valor de 0,5. El cultivo resultante se infectó con fago colaborador M13K07 (New England Biolabs) y se incubó durante una noche a 25ºC con agitación para permitir el empaquetamiento de fagos. El sobrenadante de cultivo que contenía partículas de fago rescatadas se aclaró mediante centrifugación a 2500xG y se trasladó 1 mL para a) una ronda posterior de preparación o b) cribados de unión a fab.

Preparación de fagos rondas 2-3: la segunda y tercera rondas de preparación se llevaron a cabo como en las etapas anteriores, excepto que se usó el sobrenadante de fagos rescatado de la ronda previa en lugar de la biblioteca de fagos. Las condiciones de lavado, agotamiento y las concentraciones de antígeno usadas son las presentadas en la Tabla 1.

2.6. Cribados de unión usando fabs preparados a partir de extractos periplásmicos

2.6.1. Vectores de expresión de Fab: la biblioteca XOMA031 se basa en construcciones fagémidas que también actúan como vectores de expresión de fab. Dichos vectores contienen casetes de expresión de cadena pesada y cadena ligera de fab, un promotor lac para conducir la expresión de los genes de anticuerpo, y un gen de resistencia a ampicilina. Las cadenas de anticuerpo tienen como apéndices péptidos señal N-terminales para conducir su secreción al espacio periplásmico. El extremo C de la cadena pesada también porta etiquetas de afinidad de hexa-histidina, c-myc y V5. La transformación de estos vectores en *E. coli* y la inducción con isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) da como resultado la expresión periplásmica de moléculas fab solubles.

2.6.2. Producción de Fab PPE: Los conjuntos de fagos eluídos de la ronda de preparación 3 fueron diluidos e infectados en células de *E. coli* TG1 (Lucigen) de tal modo que se generaron colonias individuales cuando se extendieron en una placa de agar 2YTCG. Esto dio como resultado que cada colonia portara un único clon de fab. Los clones individuales fueron inoculados en 1 mL de cultivos de inicio 2YTCG en bloques de pocillos profundos de 96 pocillos (VWR) usando un instrumento Qpix2 (Molecular Devices). Estos cultivos de inicio fueron crecidos durante una noche en un incubador Multitron de 3 mm (Infors) a 37ºC con una agitación de 700 rpm. Para la expresión de fab, se transfirieron 20 µL de cultivos de inicio de 1 mL a un segundo conjunto de placas de pocillos profundos que contenían 1 mL de 2YT con 0,1% de glucosa y 100 µg/mL de ampicilina. Los cultivos fueron crecidos hasta una DO 600nm promedio de 0,5-1,0 y se indujo la expresión de proteína añadiendo IPTG (Teknova) hasta una concentración final de 1 mM. Los cultivos de expresión fueron incubados durante una noche en el instrumento Multitron a 25ºC con una agitación de 700 rpm.

Las proteínas Fab secretadas en el periplasmo de *E. coli* fueron extraídas para análisis. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 2500xG, los sobrenadantes fueron desechados y los pelets resuspendidos en 75 µL de tampón PPB (Teknova) enfriado en hielo. Los extractos fueron incubados durante 10 minutos a 4ºC con una agitación de 1000 rpm, y se añadieron 225 µL de ddH_2O enfriada en hielo y se incubó durante 1 h adicional. El extracto periplásmico resultante (PPE) se aclaró mediante centrifugación a 2500xG y se transfirió a placas o tubos separados para análisis ELISA y FACS. Todos los tampones de extracción contenían Inhibidores de Proteasa Completos libres de EDTA (Roche).

Cada placa de muestras también incluye pocillos “PPE blancos” duplicados que sirvieron como controles negativos. Éstos fueron creados dejando intencionadamente dos cultivos de 1 mL sin inocular y a continuación procesándolos del mismo modo que los fab PPEs, creando con ello una muestra sin crecimiento bacteriano y por tanto sin expresión de fab.

2.6.3. Cribado primario mediante ELISA: Dos placas de 96 pocillos de extractos PPE por subcampaña fueron evaluadas en términos de unión a PVRIGHH mediante ELISA. Cabe destacar que se usó una versión no biotinilada de la proteína para el cribado ELISA para evitar la selección de biotina o ligandos de estreptavidina. La proteína recombinante PVRIGHH se diluyó a 2 µg/mL en salino tamponado con fosfato (PBS) y se recubrieron alícuotas de 50 µL sobre los pocillos de una placa EIA/RIA de alta unión (Costar) durante una noche a 4ºC. Los pocillos de placa recubierta fueron lavados dos veces con PBS e incubados con 300 µL de tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente (RT) durante 1 h. El tampón de bloqueo se eliminó y las placas fueron lavadas dos veces más con PBS. La PVRIG ligada a placa se incubó con los PPEs, se pre-bloqueó con 3% de leche desnatada, a RT durante 1 h. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS-T (PBS 7,4, 0,05% de Tween20), después tres veces con PBS y se añadieron 50 µL/pocillo de anticuerpo secundario anti-Fab humano conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:2000 en leche al 5% en PBS. Se incubó a RT durante 1 h y las placas se volvieron a lavar. Las señales ELISA fueron desarrolladas en todos los pocillos añadiendo 50 µL de sustrato Sureblue TMB (KPL Inc) y se incubó durante 5-20 minutos. La reacción HRP se detuvo añadiendo 50 µL de H_2SO_4 2N (VWR) y se leyeron las señales de absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices) o EnVision (PerkinElmer). Los pocillos que mostraron señal sobre el fondo (PPE blanco) con una ratio >3 fueron seleccionados como aciertos positivos.

2.6.4. Análisis de secuencia de fabs positivos en ELISA: los aciertos positivos del cribado ELISA fueron seleccionados y re-organizados en una nueva placa de 96 pocillos. Los clones fueron crecidos durante una noche a 37ºC y el ADN plásmido fue secuenciado usando cebadores específicos de cadena pesada y cadena ligera. Las secuencias fueron

ensambladas y analizadas usando el software Xabtracker (XOMA). Se juzgó que los clones presentaban secuencia única si había más de una diferencia no conservativa en la CDR3 de cadena pesada. Los clones con la misma, o similar, cadena pesada, pero con cadenas ligeras significativamente diferentes fueron marcadas como hermanas del clon original.

2.6.5. Cribado FACS de fabs como PPEs: Los clones fab positivos en ELISA de secuencia única fueron seleccionados y analizados para determinar su capacidad de unirse a células sobre-expresadoras de PVRIG mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los análisis se llevaron a cabo usando células HEK293 que sobre-expresan el antígeno de PVRIG humana. En un experimento paralelo, se usaron células HEK293 no transfectadas como control negativo para cada muestra de fab.

Se generaron los PPEs correspondientes a los clones fab positivos en ELISA de secuencia única como se ha descrito anteriormente. Todos los ensayos fueron llevados a cabo usando tampón FACS (1% de BSA y 0,1% de azida sódica en PBS). La PVRIG humana y las células HEK293 no transfectadas fueron recolectadas, lavadas dos veces y re-suspendidas a una densidad de $2x10^6$ células/mL. Se mezcló una alícuota de 25 µL de cada muestra de PPE y se incubó durante 1 h a 4ºC con agitación suave. También se incluyeron dos controles de PPE blanco en el análisis. Las placas fueron lavadas una vez en 200 µL de tampón FACS y se añadieron a cada pocillo 50 µL de una dilución de 2 µg/mL de un anticuerpo anti-C-myc de ratón (Roche). Tras incubación durante 30 minutos a 4ºC, las células se lavaron nuevamente y se añadieron 25 µL de una dilución de 5 µg/mL de fab-AF647 anti-ratón de cabra (Jackson Immunoresearch) a cada pocillo de PPE y de control negativo. Todos los anticuerpos secundarios fueron incubados durante 30 minutos a 4ºC. Después de dos lavados, las células fueron re-suspendidas en un volumen final de 50 µL de tampón de fijación (2% de paraformaldehído en tampón FACS). Las muestras fueron leídas en un sistema de cribado Intellicyt HTFC, registrando aproximadamente 5000 eventos por pocillo en una puerta viva designada. Los datos se analizaron usando FlowJo (De Novo Software, CA, EE.UU.) y se exportaron a Excel. Se calculó la ratio de Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) para las células HEK sobre-expresadoras de PVRIG humana y las células 293 no transfectadas usando software Xabtracker (XOMA). Los eventos positivos de cada placa fueron identificados como aquellos que proporcionan una ratio de MFI superior en 5 veces a la señal de control de PPE blanco media.

Re-formateo de aciertos fab y producción como moléculas IgG humanas: Los fabs de unión de PVRIG potenciales fueron convertidos a IgGs humanas de longitud completa para caracterización adicional. Las construcciones de expresión de proteína fueron derivadas mediante amplificación de PCR de genes de dominio variable pesado, lambda y kappa, que fueron sub-clonados en vectores pFUSE-CHig-hG1 (cadena pesada de IgG1 humana), pFUSE2-CLig-hK (cadena ligera kappa humana) o pFUSE2-CLig-hL2 (cadena ligera lambda 2 humana), respectivamente (todos los vectores de expresión fueron obtenidos en Invivogen).

Se sembraron células Expi293 (Life Technologies) a $6x10^5$ células/mL en medio Expi293 (Life Technologies) y se incubaron durante 72 horas a 37ºC en una atmósfera humidificada con un 8% de CO_2 y agitando a 125 rpm. Esta reserva celular se usó para sembrar cultivos de expresión a $2,0x10^6$ células/mL en medio Expi293. Estos cultivos se incubaron como antes, durante 24 horas con agitación a 135 rpm.

Para la transfección, las células fueron diluidas nuevamente a $2,5x10^6$ células/mL en medio Expi293. Las construcciones de expresión de proteína para cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo se mezclaron con una ratio de 1:2. Para cada 30 mL de volumen de cultivo de expresión, se diluyeron por separado 30 µg de ADN y 81 µL de Expifectamina (Life Technologies) hasta 1,5 mL con Opti-MEM (Life Technologies) y se incubaron durante cinco minutos. El ADN y la Expifectamina diluidos fueron mezclados entonces e incubados a RT durante 20 minutos. Se añadió a continuación al cultivo de expresión en un matraz agitador y se incubó como se ha descrito anteriormente, con agitación a 125 rpm.

Aproximadamente 20 h después de la transfección, se añadieron a cada matraz 150 µL de Potenciador 1 de transfección ExpiFectamina 293 y 1,5 mL de Potenciador 2 de transfección de ExpiFectamina 293. Los cultivos fueron incubados durante otros cinco días (seis días desde la transfección en total) y los sobrenadantes fueron recolectados mediante centrifugación. Las IgGs fueron purificadas de los sobrenadantes usando un FPLC AKTA Pure (GE Healthcare Bio-Sciences) y columnas de afinidad HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare Bio-Sciences) según las instrucciones del fabricante.

Cribado FACS de anticuerpos IgG1 reformateados: El cribado FACS de los anticuerpos reformateados se realizó de forma similar al cribado basado en PPE descrito en la presente memoria, excepto que se realizó una valoración dependiente de dosis de los anticuerpos purificados. Las células HEK293 que sobre-expresan PVRIG humana, o las células HEK293 no transfectadas, fueron incubadas con concentraciones variables (0 – 10 µg/mL) de los anticuerpos de PVRIG o de los controles de isotipo en tampón FACS a 4ºC durante 60 minutos. Las células fueron lavadas una vez en tampón FACS, re-suspendidas en 50 µL de IgG anti-humana conjugada a Alexa Fluor 647 (específico de fragmento Fab) diluido 1:200 e incubado durante 30 minutos a 4ºC en la oscuridad. Las células fueron lavadas dos veces y re-suspendidas en un volumen final de 80 µL de tampón FACS y yoduro de propidio (Biolegend cat nº 421301) diluido 1:1000. Las muestras fueron analizadas usando un sistema de cribado Intellicyt HTFC (Intellicyt). Los datos fueron analizados usando FlowJo (DeNovo), exportados a Excel (Microsoft) y representados en GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

QC funcional de la proteína recombinante PVRIGHH: La pureza de la proteína PVRIGHH se determinó mediante electroforesis capilar de microfluidos usando un sistema LabChip. En condiciones reductoras, la proteína recombinante migró a 80 kDa, en consistencia con su peso molecular calculado de 80,4 kDa, y mostró una pureza del 99% (datos no mostrados). En condiciones no reductoras, se observó un pico adicional que probablemente fuera consecuencia de la presencia de una forma dimérica de la proteína debida a la interacción Fc-Fc.

La integridad funcional de la proteína recombinante se determinó evaluando su unión a PVRL2 (un ligando conocido de PVRIG) en ELISA. Se observó una respuesta dependiente de dosis para la unión de PVRIGHH a PVRL2 (datos no mostrados). En comparación, no se observó unión para un control de Fc de IgG1 humana irrelevante. Considerado en conjunto, esto indica que la proteína recombinante PVRIGHH presenta una pureza elevada y es funcionalmente activa, y por tanto es adecuada para biopreparación.

QC de la proteína recombinante PVRIGHH biotinilada: La pureza de la proteína PVRIGHH biotinilada se determinó mediante electroforesis capilar de microfluidos usando un sistema LabChip. No se observaron diferencias significativas entre las proteínas no biotiniladas y biotiniladas (datos no mostrados). Cabe destacar que se observó un pico adicional de 44,3 kDa en la muestra de proteína biotinilada. Este pico puede ser resultado de la forma monomérica de la proteína PVRIGHH o quizá sea un artefacto de la reacción de parada del kit de biotinilación.

El éxito de la biotinilación se confirmó incubando la proteína biotinilada en una placa EIA recubierta de estreptavidina y detectando la proteína ligada usando un anticuerpo secundario anti-Fc de IgG1 human conjugado a HRP. La unión de la PVRIGHH biotinilada a la placa EIA recubierta de estreptavidina fue comparable a una proteína biotinilada irrelevante disponible comercialmente (datos no mostrados).

Preparación de fagos: La proteína PVRIGHH biotinilada se usó para preparación de fagos contra la biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos fab humanos XOMA031 (XOMA Corporation, Berkeley, CA). Se llevaron a cabo tres rondas de biopreparación, en 4 combinaciones diferentes de severidad de lavado, concentración de antígeno y agotamiento de ligandos de Fc (sub-campañas A – D). El éxito de cada ronda se estimó usando los títulos de salida de fagos. Se usaron guías cualitativas para definir el éxito de las sub-campañas de preparación, tales como una reducción significativa de los títulos de fagos después de la ronda 1, un aumento o mantenimiento de los títulos de fagos después de las rondas 2 y 3, y una reducción de los títulos de fagos tras aumentar la severidad de lavado o disminuir la concentración de antígeno. Las 4 sub-campañas dieron como resultado títulos de fagos en el rango esperado, que fueron consistentes entre las sub-campañas (datos no mostrados).

Cribado de producción de fagos como fab PPEs: Se cribaron dos placas de 96 pocillos de clones fab (como PPEs) para cada una de las cuatro sub-campañas para evaluar el éxito de la biopreparación. Los resultados se resumen en la Tabla 3 y se discuten con más detalle a continuación. En general, las 4 sub-campañas dieron lugar a un número significativo de fabs específicos de PVRIGHH. Se identificaron un total de 49 fabs únicos específicos de diana. Las sub-campañas B y D mostraron las mayores tasas de aciertos en ELISAS y de correlación en FACS, y fueron seleccionadas para un cribado extendido.

Tabla 3: Resumen de cribado pilado de fab PPEs. Para cada sub-campañas, se presenta el número total de clones cribados, aciertos ELISA, aciertos FACS y unicidad de secuencia. Los marcos de lectura abiertos (ORFs) representan clones que fueron secuenciados con éxito como fab de longitud completa. La especificidad se basa en la falta de unión no específica a proteínas irrelevantes en ELISA. La correlación de FACS representa el porcentaje de aciertos ELISA que también fueron positivos en FACS (específicamente unidos a células HEK293 que sobre-expresan PVRIG).

	Sub A	Sub B	Sub C	Sub D	Global
Clones cribados	182	182	182	182	728
Positivos ELISA (>3 S/N)	48	51	44	68	211
Tasa aciertos ELISA	26%	28%	24%	37%	29%
ORFs	36 (75%)	45 (88%)	35 (80%)	63 (93%)	179 (85%)
Secuencias únicas	25	21	17	31	73
Diversidad	69%	47%	49%	49%	41%
Especificidad por ELISA*	100%	100%	100%	100%	100%
Ligandos FACS (>5 S/N)	14	17	14	24	49**
Correlación FACS	56%	81%	82%	77%	67%

*No unión no específica a conjugados Fc irrelevantes o PVRL2; **35 HCs únicos, 14 hermanos.

Cribado de fab primario (ELISA): se cribaron dos placas de 96 pocillos (182 clones fab) de PPEs para cada sub-campaña mediante ELISA contra la proteína recombinante PVRIGHH. Cabe destacar que, aunque se usó proteína

biotinilada para la preparación, la versión no biotinilada se usó para el cribado ELISA, que evitó la detección de ligandos específicos de biotina o estreptavidina. Las 4 sub-campañas dieron como resultado tasas de acierto ELISA que oscilan entre 24 – 37% cuando el umbral para una señal "positiva" se fijó en una ratio de 3 para la unión específica a diana respecto a la señal de control de PPE blanco.

Fabs de cribado secundario (análisis de secuencia de ADN, ELISA y FACS): los clones positivos en ELISA fueron secuenciados para seleccionar fabs no redundantes. Se identificaron setenta y tres clones fab de secuencia única. 19 clones fueron únicos para la sub-campaña A, 13 clones fueron únicos para la sub-campaña B, 10 clones fueron únicos para la sub-campaña C, 18 clones fueron únicos para la sub-campaña D, mientras que los 23 clones restantes fueron compartidos entre las campañas. Los clones fab positivos en ELISA de secuencia única fueron re-expresados como PPEs y cribados en función de unión específica mediante FACS. Se identificó un total de 49 de 73 clones únicos como ligandos de ELISA y FACS específicos de PVRIG (siguiendo los criterios establecidos en 2.6.5). Los 49 ligandos FACS correspondieron a 35 anticuerpos con cadenas pesadas únicas y 14 hermanos que presentaban cadenas ligeras únicas, pero compartían la cadena pesada con uno de los clones únicos. En la Tabla 4 se presenta un resumen de datos de unión de FACS.

Los fabs de secuencia única también fueron evaluados para unión no específica. Todos los fab PPEs analizados se unieron a la proteína recombinantes PVRIGHH con una señal de ensayo mayor a 3 veces la del control de PPE blanco. En un ensayo paralelo, los fab PPEs fueron evaluados para determinar la unión a dos proteínas irrelevantes con la misma región Fc de IgG1, así como con la proteína recombinante PVRL2. Ninguno de los clones mostró una unión no específica significativa a los controles, lo que sugiere que los fabs seleccionados son específicos de PVRIG.

Tabla 4: resumen de unión de FACS correspondiente a PVRIG fabs. Todos los fabs positivos en ELISA únicos fueron analizados mediante FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) para las células HEK293 que sobre-expresan PVRIG, así como las células HEK293 no transfectadas. Se calculó la ratio de MFI correspondiente a unión específica de diana respecto a unión no a diana. Los clones con una ratio de MFI > 5 fueron seleccionados como aciertos y se presentan a continuación.

Clon fab	Ratio de MFI	Clon fab	Ratio de MFI
CPA.7.001	11	CPA.7.026	5,3
CPA.7.002	8,9	CPA.7.027	9,2
CPA.7.003	9,5	CPA.7.028	17
CPA.7.004	9,3	CPA.7.029	6,7
CPA.7.005	6,5	CPA.7.030	15
CPA.7.006	9,6	CPA.7.031	8,5
CPA.7.007	14	CPA.7.032	7,6
CPA.7.008	14	CPA.7.033	22
CPA.7.009	10	CPA.7.034	7,7
CPA.7.010	7,6	CPA.7.035	14
CPA.7.011	10	CPA.7.036	5
CPA.7.012	19	CPA.7.037	5,3
CPA.7.013	12	CPA.7.038	6,3
CPA.7.014	14	CPA.7.039	12
CPA.7.015	15	CPA.7.040	12
CPA.7.016	7,6	CPA.7.041	7,6
CPA.7.017	13	CPA.7.042	5,4
CPA.7.018	7,8	CPA.7.043	13
CPA.7.019	16	CPA.7.044	7,9
CPA.7.020	6,9	CPA.7.045	7,8
CPA.7.021	15	CPA.7.046	10
CPA.7.022	7,5	CPA.7.047	8,4
CPA.7.023	12	CPA.7.049	10
CPA.7.024	9,8	CPA.7.050	22
CPA.7.025	6		

Reformateo de los fabs positivos de ELISA y FACS en hIgG1: Todos los ligandos ELISA y FACS únicos fueron reformateados para expresión como moléculas IgG1 humana en células Expi293. De los 49 anticuerpos originales, 44 fueron expresados con éxito como anticuerpos de longitud completa. Dichos anticuerpos reformateados fueron evaluados para determinar la retención de unión a células HEK293 que sobre-expresan PVRIG junto con control de isotipo de IgG1 humana irrelevante. Asimismo, todos los anticuerpos también fueron evaluados contra células HEK293 no transfectadas. Los resultados de unión resultantes fueron usados para demostrar la especificidad de los anticuerpos y también se representaron para calcular la constante de equilibrio de unión (KD). Nueve de los restantes 44 anticuerpos mostraron una unión débil o una unión no específica significativa. Los restantes 35 anticuerpos fueron seleccionados para un análisis adicional en ensayos funcionales basados en células. Las KD basadas en FACS de dichos anticuerpos se presentan en la Tabla 6. Los valores de KD oscilan entre 0,30 nM y 96 nM, con una media de 9,4 nM, lo que sugiere que la mayoría de los anticuerpos de la campaña de preparación son muy específicos y se unen a PVRIG con alta afinidad.

Tabla 5: Resumen de expresión y unión de anticuerpos reformateados. Todos los fabs positivos en ELISA y FACS únicos fueron reformateados en la cadena principal de IgG1 humana. Los valores KD de FACS se determinaron mediante valoración de dosis contra las células HEK293 que sobre-expresan PVRIG. La unión no a diana se determinó mediante valoración de dosis contra las células HEK293 no transfectadas.

Anticuerpo	KD de FACS (nM)	Anticuerpo	KD de FACS (nM)
CPA.7.001	No expresión	CPA.7.026	No ligando
CPA.7.002	44,35	CPA.7.027	No ligando
CPA.7.003	Unión no específica	CPA.7.028	7,14
CPA.7.004	21,71	CPA.7.029	Unión débil
CPA.7.005	95,56	CPA.7.030	No expresión
CPA.7.006	No expresión	CPA.7.031	No ligando
CPA.7.007	0,73	CPA.7.032	8,78
CPA.7.008	No expresión	CPA.7.033	12,8
CPA.7.009	33,00	CPA.7.034	14,2
CPA.7.010	21,89	CPA.7.035	No ligando
CPA.7.011	66,02	CPA.7.036	6,0
CPA.7.012	0,30	CPA.7.037	Unión no específica
CPA.7.013	No expresión	CPA.7.038	20,26
CPA.7.014	2,04	CPA.7.039	3,76
CPA.7.015	1,34	CPA.7.040	0,79
CPA.7.016	22,02	CPA.7.041	52,2
CPA.7.017	1,82	CPA.7.042	24,26
CPA.7.018	9,29	CPA.7.043	13,2
CPA.7.019	0,45	CPA.7.044	9,4
CPA.7.020	86,97	CPA.7.045	3,73
CPA.7.021	11,22	CPA.7.046	Unión no específica
CPA.7.022	4,17	CPA.7.047	5,36
CPA.7.023	4,08	CPA.7.049	19,9
CPA.7.024	9,08	CPA.7.050	68,3
CPA.7.025	No ligando		

Resumen y conclusiones

Se llevó a cabo una campaña de descubrimiento de anticuerpos de presentación de fagos para aislar ligandos contra la diana inmuno-oncológica PVRIG usando una versión marcada con Fc recombinante del antígeno. El análisis de control de calidad mostró que la preparación de antígenos fue pura y funcionalmente activa. El esfuerzo de preparación dio como resultado 49 clones fab únicos que se unieron específicamente a la diana PVRIG, tanto en forma de proteína recombinante como sobre la superficie celular. De éstos, 35 fueron producidos con éxito como anticuerpos IgG1 humanos y se demostró que retenían la unión específica a PVRIG. Este conjunto de anticuerpos mostró mayores afinidades en un ensayo de FACS, mostrando 18 de los 35 anticuerpos una unión con una KD < 10 nM.

Ejemplo 10. Demostración de la capacidad de los fabs anti-PVRIG humana para bloquear la interacción entre PVRIG y PVRL2 mediante ELISA.

Método: Se recubrió la PVRL2-His humana (Catálogo nº 2229-N2-050/CF, R&D Systems), sobre la placa ELISA. Se preincubaron extractos periplásmisos de Fab (PPEs), diluidos 1:1 en 5% de leche desnatada, con 1 µg/mL (concentración final) de la PVRIG-Fc humana, durante 15 minutos a RT. La mezcla fab-receptor se dejó unir a la PVRL2-His recubierta sobre la placa ELISA. Se evaluó la interacción PVRIG-Fc/PVRL2-His usando un anticuerpo anti-Fc humano, conjugado a HRP (Jackson Immuno Research catálogo nº 709-035-098). En ausencia de PPE (células negativas), era de esperar una fuerte señal positiva. Para los fabs bloqueantes, la señal se vería reducida significativamente. Los clones fab con una señal >5 veces inferior a la de los pocillos negativos (>80% de bloqueo) se podrían seleccionar como fabs bloqueantes.

Protocolo:

Se recubrieron placas ELISA (Costar 9018) con 50 µL de 2 µg/mL de antígeno y se almacenaron a 4ºC durante una noche. Las placas recubiertas de antígeno fueron lavadas 3 veces con 1X PBS. La placa fue bloqueada con 200 µL de leche desnatada al 5% en PBS y se incubó 1 h a RT (temperatura ambiente). A continuación, la placa se lavó con 1X PB.

Tras añadir 50 µL/pocillo de PPEs de Fab (diluidos en leche desnatada al 5%), la placa fue preincubada con 1 µg/mL de PVRIG-Fc humana que se añadió a los respectivos pocillos. El control de “no fab” se llevó a cabo con 2 pocillos.

La placa se incubó 1 h a RT.

Las placas se lavaron 3 veces con 1X PBST y 3 veces con 1X PBS.

Tras añadir 50 µL/pocillo del anticuerpo secundario conjugado a HRP (Jackson Immuno Research, 709-035-098), diluido en leche al 5% en PBS, la placa se incubó 1 h a RT.

Las placas se lavaron 3 veces con 1X PBST y 3 veces con 1X PBS.

Tras añadir 50 µL/pocillo del sustrato de TMB y esperar hasta que el color se desarrollase, se detuvo la reacción añadiendo 50 µL/pocillo de H_2SO_4 2N. Se midió la absorbancia a 450 nm.

Resultados

La Figura 52 muestra los resultados de la evaluación de los anticuerpos anti-PVRIG para determinar su capacidad de bloquear al menos el 80% de la unión de PVRL2 a PVRIG. Como se muestra, un gran número de dichos anticuerpos fue capaz de bloquear con éxito al menos el 80% de la unión. Específicamente, los anticuerpos que bloquearon con éxito se designan como se indica a continuación:

CPA.7.001, CPA.7.003, CPA.7.004, CPA.7.006, CPA.7.008, CPA.7.009, CPA.7.010, CPA.7.011, CPA.7.012, CPA.7.013, CPA.7.014, CPA.7.015, CPA.7.017, CPA.7.018, CPA.7.019, CPA.7.021, CPA.7.022, CPA.7.023, CPA.7.024, CPA.7.033, CPA.7.034, CPA.7.036, CPA.7.040, CPA.7.046, CPA.7.047, CPA.7.049, CPA.7.050.

Ejemplo 11: Estudio de Resonancia de Plasmón Superficial del Contenedor de Epítopos de 37 anticuerpos IgG anti-PVRIG que se unen a la proteína de fusión PVRIG humana

Materiales y Métodos

Los experimentos se llevaron a cabo usando un instrumento ProteOn XPR 36 a 22ºC con todas las muestras mantenidas a 4ºC durante el experimento.

Etapa 1: Los siguientes mAbs anti-PVRIG fueron diluidos a ~10 µg/mL en acetato sódico 10 mM, pH 5,0, e inmovilizados covalentemente en puntos independientes de un chip biosensor ProteOn GLC usando acoplamiento de aminas estándar:

CPA.7.002	CPA.7.017	CPA.7.033
CPA.7.003	CPA.7.018	CPA.7.034
CPA.7.004	CPA.7.019	CPA.7.036
CPA.7.005	CPA.7.020	CPA.7.037
CPA.7.007	CPA.7.021	CPA.7.038
CPA.7.009	CPA.7.022	CPA.7.039
CPA.7.010	CPA.7.023	CPA.7.040
CPA.7.011	CPA.7.024	CPA.7.043

CPA.7.012	CPA.7.026	CPA.7.045
CPA.7.014	CPA.7.028	CPA.7.046
CPA.7.015	CPA.7.029	CPA.7.047
CPA.7.016	CPA.7.032	CPA.7.050

La etapa de activación se produjo en la dirección de flujo horizontal durante cinco minutos, mientras que la etapa de inmovilización se produjo en la dirección de flujo vertical. Los mAbs fueron inyectados durante cuatro minutos después de la activación de la superficie. La etapa de bloqueo tuvo lugar tanto en la posición vertical como en la horizontal, cinco minutos en cada, de tal modo que los "interpuntos" horizontales pudieran usarse como superficies de referencia. Los mAbs fueron inmovilizados en un rango de ~450RU-5000RU. También se agrupó un mAb adicional CPA.7.041 en este estudio, pero solo como analito en disolución. Ver más adelante.

Etapa 2: Experimentos preliminares implicaron varios ciclos de inyección de antígeno PVRIG ~20 nM (PVRIGHH-2-1-1 nº448, GenScript) sobre todos los mAbs inmovilizados durante tres minutos con un caudal de 25 µL/min seguido de regeneración con un pulso de 30 segundos de glicina-HCl 10 mM, a pH 2,0 o pH 2,5, dependiendo de la fila horizontal de mAbs en el sistema de chip GLC. Las muestras de antígeno fueron preparadas en tampón de elución PBST desgasificado (PBS con un 0,05% de Tween 20) con 100 µg/mL de BSA. Estos experimentos preliminares demostraron que los clones CPA.7.026 y CPA.7.029 no se unieron al antígeno y por lo tanto no se incluyeron en el contenedor. Los mAbs restantes del sistema ProteOn mostraron una unión reproducible al antígeno.

Etapa 3: Se llevó a cabo un protocolo de agrupamiento de epítopos de "pre-mezcla" debido a la bivalencia del antígeno de PVRIG de fusión-fc. En dicho protocolo, cada mAb enumerado en la Etapa 1, más el mAb CPA.7.041, fue pre-mezclado con antígeno PVRIG y a continuación inyectado durante tres minutos sobre todos los mAbs inmovilizados. La concentración molar en el sitio de unión de cada mAb estaba en exceso respecto a la concentración molar de antígeno en el sitio de unión. La concentración final en el sitio de unión de cada mAb fue ~400 nM y la concentración final de antígeno en el sitio de unión fue ~20 nM. Se llevó a cabo un ciclo de control de solo antígeno después de cada ocho ciclos de inyección de mAb para monitorizar la actividad de los mAbs inmovilizados a lo largo del experimento. También se llevaron a cabo inyección de blanco con tampón después de aproximadamente cada ocho ciclos de inyección de mAb para una doble referencia. Los controles adicionales incluyeron cada mAb inyectado solo sobre todos los mAbs inmovilizados en concentraciones idénticas a las de los ciclos de inyección de pre-mezcla. Todas las superficies fueron regeneradas con un pulso de 30 s de glicina-HCl 10 mM a pH 2,0 o pH 2,5, dependiendo de qué fila de mAbs del sistema se estuviera regenerando, y todos los ciclos fueron eluídos con un caudal de 25 µL/min. Las muestras de mAb y antígeno se prepararon en tampón de elución PBST desgasificado con 100 µg/mL de BSA.

Etapa 4: Los datos de sensograma fueron procesados y referenciados usando ProteOn Manager Versión 3.1.0.6 usando interpuntos y blancos de tampón para doble referencia. Las inyecciones de control solo de mAb fueron usadas como referencias de inyección, donde se observó una unión significativa con las inyecciones de solo mAb. Un par de anticuerpo era clasificado como que tenía un epítopo de unión de antígeno compartido (designado como un "0" rojo en la matriz de la Figura 43) si no se observaba unión de la inyección de mAb y antígeno mixtos sobre el mAb inmovilizado, o si la unión se veía reducida significativamente en comparación con la inyección de control de solo antígeno sobre el mismo mAb inmovilizado. Un par de anticuerpo era clasificado como unión a diferentes epítopos de antígeno, o "que forma un sándwich" con el antígeno (designado como "1" verde en la matriz de la Figura 43) si la inyección de mAb y antígeno mixtos mostraba una unión al mAb inmovilizado similar o mayor a la del control de solo antígeno sobre el mismo mAb inmovilizado.

Etapa 5: El patrón de bloqueo para el mAb CPA.7.041 (nº37) se estudió solo como un analito porque el sistema de chip GLC solo tiene 36 posiciones. Por tanto, por consistencia, el agrupamiento jerárquico de los patrones de unión de la matriz binaria para cada mAb pre-mezclado con antígeno (patrones verticales de la Figura 42) se llevó a cabo usando el software JMP versión 11.0.0. Los patrones de bloqueo de los mAbs inmovilizados (patrones horizontales de la Figura 42) también fueron agrupados a modo de comparación con los patrones de bloqueo de los mAbs pre-mezclados en disolución (datos no mostrados, ver el apartado de Resultados para una discusión).

Resultados: La Figura 42 muestra la matriz binaria de bloqueo ("0") o formación de sándwich ("1") entre cada par de mAb, donde los mAbs se presentan en idéntico orden tanto verticalmente (mAbs sobre la superficie – "ligandos") como horizontalmente (mAbs en disolución – "analitos"). Los "contenedores" idénticos de patrones de bloqueo para todos los mAbs como analitos están destacados en la Figura 42 con un recuadro negro alrededor de cada grupo de patrones verticales similares. La Figura 43 muestra el dendograma de los patrones de bloqueo verticales (analito) de la matriz de la Figura 42. Para la definición más estricta de "contenedor" de epítopos, donde solo técnicamente se incluyen juntos los mAbs que muestran patrones de bloqueo idénticos, existen un total de 4 contenedores discretos. Específicamente, 33 de los 35 mAbs que fueron agrupados comprenden dos contenedores donde la única diferencia entre dichos dos contenedores es si un mAb forma un sándwich (Contenedor 2, ver Figura 42 y Figura 43) o bloquea (Contenedor 1, ver Figura 42 y Figura 43) la unión a CPA.7.039. Esto significa que la CPA.7.039 está en su propio contenedor separado. El cuarto contenedor consiste solo en el mAb CPA.7.050 que es incapaz de bloquear la unión a antígeno de ninguno de los otros 34 mAbs. La agrupación jerárquica de los patrones de bloqueo de los mAbs como

ligandos (patrones horizontales de la Figura 42) mostró el mAb CPA.7.016 que forma un sándwich con el antígeno y mAb CPA.7.039, mientras que como analito bloquea la unión a antígeno al CPA.7.039 inmovilizado. Por tanto, el clon CPA.7.016 se ubicaría en el contenedor 2 más que en el contenedor 1. Los mAbs de cada contenedor se enumeran en la Figura 43. Los datos de sensograma procesados representativos de cada contenedor se muestran en la Figura 44 a la Figura 47.

Resumen: 35 mAbs IgG anti-PVRIG fueron agrupados en contenedores usando SPR según sus patrones de bloqueo por pares con PVRIG humana de fusión fc. Según la definición más estricta de contenedor de epítopos, hay un total de cuatro contenedores discretos. 33 de los 35 mAbs comprenden dos contenedores que difieren solo en si sus respectivos componentes mAbs bloquean o forma un sándwich de antígeno con el clon CPA.7.039.

Ejemplo 12. Cribado cinético de Resonancia de Plasmón Superficial de 50 fabs anti-PVRIG humana preparados en extractos periplásmicos

Materiales y Métodos

Todos los experimentos fueron llevados a cabo usando un instrumento Biacore 3000 y un instrumento ProteOn XPR 36 a 22ºC.

Etapa 1: La concentración molar de los 52 fabs del sobrenadante de extracto periplásmico fueron cuantificados usando un instrumento Biacore 3000 a 22ºC. Cada fab fue diluido 20 veces y a continuación se inyectó durante 2 minutos a 5 µL/min en superficies de fab anti-humano de alta densidad (GE Healthcare 28-9583-25) preparadas usando acoplamiento de aminas estándar con un chip Biacore CM5 (GE Healthcare). A continuación, se inyectó un fab humano a una concentración conocida (Bethyl P80-115) sobre la superficie anti-fab con las mismas condiciones que los sobrenadantes de fab. Las muestras se prepararon en el tampón de elución que fue HBSP desgasificado (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, 0,005% de P20, pH 7,4) añadiendo BSA al 0,01%. Se ajustaron las pendientes de asociación de cada sensograma SPR de cada sobrenadante de fab contra la pendiente de asociación SPR del fab humano estándar de concentración conocida usando el software CLAMP 3.40 para estimar las concentraciones molares de cada fab en el sobrenadante.

Etapa 2: Se preparó una superficie de anticuerpo policlonal fc anti-humano de cabra de alta densidad (Invitrogen H10500) usando acoplamiento de aminas estándar en dos calles de un chip GLC usando un biosensor ProteOn XPR 36. Se preparó una superficie de anticuerpo policlonal fc anti-ratón de alta densidad (GE Healthcare BR-1008-38) usando acoplamiento de aminas estándar sobre dos calles diferentes del mismo chip GLC. Las etapas de activación y bloqueo para las cuatro superficies de captura se produjeron en la dirección de flujo vertical. Cada fab del sobrenadante fue inyectado entonces a tres concentraciones sobre PVRIG human de fusión fc (PVRIG-HH-2-1-1 nº 448, GenScript) y la PVRIG de ratón de fusión fc (PVRIG-MM-2-1-1 nº 198, GenScript) que fueron capturados en una superficie de fc anti-humana de alta densidad y una superficie de fc anti-ratón (respectivamente) con una media de ~200RU y ~290RU por ciclo, respectivamente. Cada serie de concentración de fab se inyectó durante dos minutos seguido de 10 minutos de disociación a un caudal de 50 µL/min. El rango de concentraciones de partida (como se determina en la Etapa 1) fue de ~20nM - ~400nM con dos diluciones de tres veces de la mayor concentración para cada fab. Los fabs fueron diluidos en el tampón de elución que fue PBS desgasificado con un 0,05% de Tween 20 y un 0,01% de BSA añadidos. Las superficies de captura de fc anti-humanas fueron regeneradas con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 146 mM después de cada ciclo y las superficies de fc anti-ratón fueron regeneradas con dos pulsos de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 1,7, después de cada ciclo.

Etapa 3: Los datos de sensograma de fabs den la unión de sobrenadante a PVRIG capturada fueron procesados y doblemente referenciados usando el ProteOn Manager versión 3.1.0.6. Los sensogramas fueron doblemente referenciados usando las correspondientes superficies de captura anti-especies sin PVRIG capturada como valores de referencia y una inyección de blanco sobre la PVRIG capturada en condiciones idénticas a las inyecciones de los fabs. Cuando fue posible, los sensogramas de las tres concentraciones diferentes de cada fab fueron ajustados entonces globalmente a un modelo cinético 1:1 (con un término para el transporte de materia) para estimar las constantes de velocidad de asociación y disociación. Los sensogramas que no mostraron una unión 1:1 sencilla no fueron ajustados al modelo cinético y por lo tanto no se les asignaron estimaciones de k_a y k_d.

Resultados

Ninguno de los fabs incluidos en este estudio mostró actividad de unión a PVRIG de ratón (datos no mostrados). Los sensogramas de 17 de los 50 fabs cribados contra PVRIG humana pudieron ser ajustados para obtener estimaciones fiables de sus constantes cinéticas. Veintiocho clones mostraron cinéticas complejas, cinco de los fabs no mostraron ninguna unión a la proteína de fusión de PVRIG humana capturada (CPA.7.025, CPA.7.026, CPA.7.027, CPA.7.029, CPA.7.035) y un clon (CPA.7.035) no mostró título cuando se realizó la determinación de concentración de la Etapa 1. Las constantes cinéticas y sus correspondientes sensogramas se muestran más adelante en la Figura 49 y la Figura 50. Los clones enumerados a continuación mostraron cinéticas complejas. La Figura 51 muestra algunos ejemplos de estos datos.

CPA.7.001 CPA.7.006 CPA.7.013 CPA.7.045

CPA.7.030	CPA.7.036	CPA.7.014	CPA.7.046
CPA.7.031	CPA.7.037	CPA.7.041	CPA.7.017
CPA.7.032	CPA.7.009	CPA.7.042	CPA.7.018
CPA.7.033	CPA.7.038	CPA.7.043	CPA.7.047
CPA.7.034	CPA.7.039	CPA.7.016	CPA.7.023
CPA.7.003	CPA.7.011	CPA.7.044	CPA.7.024

Ejemplo 13: Medida de la afinidad de unión del clon de IgG CPA.7.021 a PVRIG expresada en células HEK usando citometría de flujo

Materiales y Métodos

Se usó citometría de flujo para medir la afinidad de la unión de IgG CPA.7.021 a PVRIG humana expresada sobre células HEK 293. Se añadió CPA.7.021 conjugado con Alexa 647 por duplicado en un rango de concentración de sitio de unión de 3 pM – 101 nM en una dilución en serie de 2 veces, a un número constante de células (100.000 células/pocillo) en 17 pocillos de una placa de 96 pocillos. Un pocillo contenía células sin ninguna IgG añadida, para servir como pocillo de blanco. Las células fueron equilibradas durante 4 horas con IgG a 4ºC. Las células fueron lavadas dos veces y a continuación se registró la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) de aproximadamente 10.000 “eventos” usando un citómetro de flujo Intellicyte. Los valores MFI resultantes en función de la concentración en el sitio de unión de IgG CPA.7.021 se muestran a continuación. La KD de la unión de CPA.7.021 a células HEK 293 que expresan PVRIG human se estimó mediante un ajuste de la curva de MFI frente a concentración de sitio de unión de IgG con un modelo de equilibrio 1:1, como se detalla en Drake y Klakamp, Journal of Immunol Methods, 318 (2007) 147-152.

Resultados: La IgG CPA.7.021 marcada con Alexa 647 fue valorada con células HEK 293 que expresan PVRIG humana y se midió la señal de unión usando citometría de flujo. La isoterma de unión resultante, que muestra el MFI por duplicado frente a la concentración en el sitio de unión del CPA.7.021, se presenta a continuación. La línea roja es un ajuste de equilibrio 1:1 de la curva que permite una estimación de KD de 2,5 nM ± 0,5 nM (intervalo de confianza al 95% del ajuste, N=1).

Ejemplo 14: Efecto del bloqueo (KD) de PVRIG y anticuerpo anti-PVRIG sobre la función de TILs específicos de melanoma humano

El objetivo de estos ensayos es evaluar la capacidad funcional de la PVRIG en TILs derivados de humano, medida a través de marcadores de activación y de la secreción de citoquinas, tras co-cultivo con células diana de melanoma. Se usó PD1 como punto de control inmune de comparación para los estudios de bloqueo (siARN). Se evaluó el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.21), que se ha demostrado que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2, solo o en combinación con otros anticuerpos (p.ej., un TIGIT, DNAM1).

Materiales y Métodos

TILs

Linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) de tres pacientes de melanoma:

- TIL-412- HLA-A2-Mart1 específico
- TIL-F4- HLA-A2-gp100 específico
- TIL-209- HLA-A2-gp100 específico

Los TILs fueron descongelados en medio IMDM completo (BI, 01-058-1A) suplementado con un 10% de suero humano (Sigma, H3667) + 1% de glutamax (Life technologies, 35050-038) + 1% de Na-Piruvato (Biological Industries, 03-042-1B) + 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries, 01-340-1B) + 1% de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 U/mL de rhIL2 (Biolegend, 509129).

Líneas celulares tumorales: Células de melanoma humano Mel-624 que expresan los antígenos MART-1 y gp-100 en el contexto de haplotipo de MHC-I HLA-A2. Las células fueron cultivadas en medio DMEM completo (Biological Industries, 01-055-1A) suplementado con 10% de FBS (BI, 04-127-1A), tampón HEPES 25 mM (BI, 03-025-1B), 1% de glutamax (Life technologies, 35050-038), y 1% de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B).

Bloqueo en TILs: El bloqueo (KD) de PVRIG humana y PD1 humana en TILs se realizó usando 100 pmol de Dharmacon ON-TARGETplus siARN de PVRIG humana - SMARTpool (L-032703-02) o siARN de PD1 humana - SMARTpool (L-004435) o siARN no diana (D-001810-01-05). El siARN fue electroporado a TILs (AMAXA, programa X-005). La electroporación se realizó en TILs en reposo cultivadas en IMDM completo suplementado con IL-2 24 h después de la descongelación. Tras la electroporación, las TILs fueron sembradas en placas TC de 96 pocillos para

recuperar durante 24 h. Después de 24 h, las células fueron recolectada y teñidas con colorante de viabilidad (BD Horizon; Cat nº 562247, BD biosciences), se lavaron con PBS y se tiñeron con CPA.7.021 anti-PVRIG humana (CPA.7.021 IgG2 A647, 7,5 µg/mL) con anti-PD-1 humana (Biolegend, nº 329910 AF647, 5 µg/mL) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los controles de isotipo usados son synagis (IgG2 A647, 7,5 µg/mL) e IgG1 de ratón (Biolegend nº 400130 A647, 5 µg/mL), respectivamente. Todas las muestras fueron analizadas en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos fueron analizados usando el software FlowJo (v. 10.0.8).

Co-cultivo de TILs con células de melanoma 624: TILs electroporados con siARN fueron recolectados y sembrados en una placa TC 96 $5x10^4$/pocillo. Las células Mel-624 también fueron recolectadas y sembradas en co-cultivo con ratios E:T de 1:1 / 1:3. La placa se incubó durante una noche (18h) a 37ºC con un 5% de CO_2.

Para determinar el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), anti-TIGIT (clon 10A7) y anti-DNAM1 (clon DX11) sobre la actividad de TIL específica de melanoma, se pre-incubaron TILs ($1x10^5$ células/pocillo) con anticuerpos evaluados o controles de isotipo relevantes en mono-tratamiento (10 µg/mL) o en tratamiento de combinación (final 10 µg/mL para cada uno) antes de la adición de células diana de melanoma 624 con una ratio efector:diana (E:T) de 1:1. La placa se incubó durante una noche (18h) a 37ºC con un 5% de CO_2.

Determinación de la activación de TILs: 16 h post co-cultivo, las células fueron teñidas con colorante de viabilidad (BD Horizon; Cat nº 562247, BD biosciences), lavadas con BPS y expuestas a disolución bloqueante de Fc (cat nº 309804, Biolegend), seguido de tinción superficial con anti-CD8a (Cat nº 301048, Biolegend) y anti-CD137 (Cat nº 309804, Biolegend) a 4ºC durante 30 min. Todas las muestras fueron analizadas en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron usando el software FlowJo (v10.0.8). Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y analizados para determinar la secreción de citoquinas mediante el kit CBA (cat nº 560484, BD).

Resultados

Bloqueo de PVRIG en TILs: se cultivaron TIL MART-1 y TIL F4 24 h con IL-2. Se electroporaron a TILs (AMAXA, programa X-005) 100 pmol de ON-TARGETplus siARN de PVRIG humana - SMARTpool (L-032703-02) o siARN de PD1 humana - SMARTpool (L-004435) o siARN no diana (D-001810-01-05). La detección de PVRIG o de PD-1 se llevó a cabo 24 h después de la electroporación (y antes del co-cultivo). Las células fueron teñidas con colorante de viabilidad seguido de 30 min de incubación RT con anti-PVRIG y anti-PD-1. El porcentaje de población KD se indica en la Figura 82.

Ensayos funcionales con TILs bloqueados: Los TILs humanos, cultivados durante 24 horas con IL2 fueron electroporados con siARN que codifica para PVRIG o PD-1 humanas o con secuencia mezclada como control. Los TILs fueron evaluados para expresión de PVRIG o PD-1 24 horas después de la electroporación. Se observó ~80% de bloqueo de PVRIG y ~50% de bloqueo de PD-1 en comparación con los TILs electroporados con mezcla (Figura 82).

Los TILs KD fueron cultivados con células Mel-624 con una ratio E:T de 1:1 o 1:3 durante 18 h y se tiñeron para la expresión de CD137. Se observaron niveles elevados de marcador de activación CD137 en TIL MART-1 electroporados con siARN de PVRIG, de forma similar a TILs que fueron electroporados con siARN de PD-1, en comparación con siARN mezclado de control (Figura 83A). Se recolectó el sobrenadante de co-cultivo y se evaluó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. Los TILs que fueron electroporados con siARN de PVRIG muestran un aumento significativo de los niveles de IFNγ y TNF en comparación con el siARN SCR de control. Se observó un efecto similar en los TILs que fueron electroporados con siARN de PD-1 (Figura 83B-C).

Se observó la misma tendencia de aumento de los niveles de activación en TIL F4. El co-cultivo de TIL F4 electroporado con siARN de PVRIG con células Mel-624 a una E:T de 1:3 dio lugar a un aumento de los niveles de expresión superficial de CD137 (Figura 84A), así como a un aumento de la secreción de IFNγ en el sobrenadante del co-cultivo (Figura 84B). Se observó una tendencia similar con los TILs que fueron electroporados con siARN de PD-1.

Ensayo funcional usando Abs de bloqueo:

Monoterapia y terapia de combinación *in vitro* de anti-PVRIG y anti-TIGIT: Se cultivaron TILs 209 con células Mel-624 a una E:T de 1:1 durante 18h. Se recolectó el sobrenadante de co-cultivo y se evaluó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento con anti-TIGIT no afectó a los niveles de secreción de IFNγ o TNF. Sin embargo, se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadió anti-TIGIT y anti-PVRIG al co-cultivo en combinación (Figura 85A-B).

Monoterapia y terapia de combinación *in vitro* de anti-PVRIG y anti-TIGIT: Se cultivaron TILs 209 con células Mel-624 a una E:T de 1:1 durante 18h. Los TILs fueron teñidos para expresión superficial de marcador de activación CD137 y mostraron un nivel reducido de expresión tras tratamiento con anti-DNAM1. Se recolectó el sobrenadante de co-cultivo y se evaluó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento con anti-DNAM-1 medió una tendencia de aumento de las citoquinas secretadas IFNγ y TNF. El tratamiento con la combinación de anti-DNAM-1 y anti-PVRIG revertió parcialmente el efecto sobre la expresión de CD137 (Figura 86C) y potenció el efecto sobre la

secreción de citoquinas IFNγ y TNF (Figura 5A-B). Se cultivó TILs MART-1 con células Mel-624 a una E:T de 1:1 durante 18h. Se recolectó el sobrenadante de co-cultivo y se evaluó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento con anti-DNAM-1 redujo la expresión superficial de CD137 en TILs y también redujo las citoquinas secretadas IFNγ y TNF. El tratamiento con la combinación de anti-DNAM-1 y anti-PVRIG revertió parcialmente estos efectos (Figura 86D-F).

Resumen y conclusiones

El bloqueo KD de PD1 mejoró la actividad de TIL, medida a través de la secreción de IFNγ y TNF en TILs F4 y MART-1. Se observó un aumento (~20%) de la secreción de IFNγ y TNF tras el KD de PVRIG en TILs MART-1 en comparación con el siARN de control. Se observó la misma tendencia en la expresión de CD137 tras co-cultivo con células de melanoma 624 en TILs F4.

El tratamiento de anti-TIGIT no afectó a los niveles de secreción de IFNγ o TNF de TILs co-cultivados con Mels 624, sin embargo, se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadió anti-TIGIT y anti-PVRIG (CPA.7.021) al co-cultivo en combinación.

El tratamiento con anti-DNAM-1 redujo la activación de TIL-MART-1, manifestado a través de la reducción de la secreción de CD137 y citoquinas, y el anti-PVRIG (CPA.7.21) pudo revertir parcialmente este efecto en el tratamiento de combinación con Ab DNAM-1. En TIL 209, los niveles de secreción de IFNγ y TNF se elevaron ligeramente (~10%) con anti-DNAM-1, y se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF (~40% y 30%, respectivamente) cuando se añadieron anti-DNAM1 y anti-PVRIG (CPA.7.021) al co-cultivo en combinación. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la PVRIG es un nuevo receptor co-inhibidor para PVRL2.

Ejemplo 15: Efecto del anticuerpo anti-PVRIG en la función de TILs específicos de melanoma humano en combinación con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD1

Materiales y Métodos

TILs: Linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) de tres pacientes de melanoma:

- TIL-412- HLA-A2-Mart1 específico
- TIL-F4- HLA-A2-gp100 específico
- TIL-209- HLA-A2-gp100 específico

Los TILs fueron descongelados en medio IMDM completo (BI, 01-058-1A) suplementado con un 10% de suero humano (Sigma, H3667) + 1% de glutamax (Life technologies, 35050-038) + 1% de Na-Piruvato (Biological Industries, 03-042-1B) + 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries, 01-340-1B) + 1% de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 U/mL de rhIL2 (Biolegend, 509129).

Líneas celulares tumorales: Células de melanoma humano Mel-624 que expresan los antígenos MART-1 y gp-100 en el contexto de haplotipo de MHC-I HLA-A2. Las células fueron cultivadas en medio DMEM completo (Biological Industries, 01-055-1A) suplementado con 10% de FBS (BI, 04-127-1A), tampón HEPES 25 mM (BI, 03-025-1B), 1% de glutamax (Life technologies, 35050-038), y 1% de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B).

Co-cultivo de TILs con células de melanoma 624 en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-PVRIG, anti-TIGIT y PD1: Para determinar el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), anti-TIGIT (clon 10A7) y anti-PD1 (mAb 1B8, Merck) sobre la actividad de TIL específica de melanoma, se pre-incubaron TILs ($3x10^4$ células/pocillo) con anticuerpos evaluados o controles de isotipo relevantes en mono-tratamiento (10 µg/mL) o en tratamiento de combinación (final 10 µg/mL para cada uno) antes de la adición de células diana de melanoma 624 con una ratio efector:diana (E:T) de 1:3. La placa se incubó durante una noche (18h) a 37ºC con un 5% de CO_2.

Determinación de la activación de TILs: Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y analizados para determinar la secreción de citoquinas mediante el kit CBA (cat nº 560484, BD).

Monoterapia *in vitro* de anti-PVRIG y terapia de combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD1: Se cultivaron TILs F4 (específicos de gp100) con células Mel-624 a una E:T de 1:3 durante 18h. Se recolectó el sobrenadante de co-cultivo y se evaluó para determinar la presencia de citoquinas secretadas. El tratamiento con anti-TIGIT o anti-PD1 no afectó a los niveles de secreción de IFNγ o TNF. Sin embargo, se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF cuando se añadió anti-TIGIT o anti-PD1 en combinación con anti-PVRIG al co-cultivo en combinación (Figura 87A-B).

El tratamiento de anti-PVRIG, anti-TIGIT y PD1 solo no afectaron a los niveles de secreción de IFNγ o TNF del co-cultivo de TILs con Mels 624, sin embargo, se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF cuando los anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD1 fueron añadidos en combinación con anti-PVRIG (CPA.7.021). Los datos presentados sugieren que existe un efecto sinérgico para la terapia de combinación con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD1.

Ejemplo 16: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG sobre la señalización TCR usando un ensayo génico informador

Se usa un sistema de ensayo informador para señalización de TCR, tal como la línea celular Jurkat-NFAT-Luc, para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la señalización mediada por TCR. Esta línea celular Jurkat derivada expresa el gen indicador de luciferasa bajo el control del elemento de respuesta NFAT. Estas células son transfectadas con un vector que codifica PVRIG humana de longitud completa. Como control negativo, se usan células transfectadas con vector vacío. Los transfectantes con vectores que codifican para moléculas de referencia coestimuladoras o coinhibidoras, tal como CD28 y PD-1, sirven como control positivo. Los transfectantes son estimulados mediante la adición de anti-CD3 humano (p.ej., OKT3) en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-PVRIG. El control de isotipo sirve como control negativo. Los anticuerpos funcionales conocidos contra las moléculas de referencia sirven como controles positivos. Es de esperar que un anticuerpo reticulante agonístico funcional muestre un efecto inhibidor sobre la actividad de luciferasa.

Ejemplo 17: Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T usando PVRL2-Fc

Se usó un ensayo ligado a placa para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T, la proliferación y la secreción de citoquinas. Se estimularon células T en bruto humanas purificadas usando 1 µg/mL de anti-CD3 humano ligado a placa (p.ej., OKT3) y 5 µg/mL de PVRL2-Fc (proteína fusionada recombinante compuesta del ECD de PVRL2, la contrapartida de PVRIG) o control negativo. La activación de células T se evalúa a través de la expresión de marcadores de activación, p.ej., CD137, o mediante división celular evaluada a través de la dilución de colorante CFSE (las células T son marcadas con CFSE antes de su estimulación). También se determina la producción de citoquinas (p.ej., IFNg, IL-2) como lectura adicional de la activación de células T. Se usan los marcadores de subtipo de células T para distinguir los efectos específicos sobre las células T CD4 o CD8. La PVRL2-Fc co-inmovilizada podría presentar un efecto estimulador basal sobre la activación de células T, mediado a través de DNAM1 endógena – un receptor de contrapartida coestimulador conocido de PVRL2 en células T. En presencia de Abs anti-PVRIG, este efecto basal estimulador de PVRL2-Fc es de esperar que se vea potenciado adicionalmente, debido a su bloqueo de la influencia inhibidora de la PVRIG endógena sobre la activación de células T. Por consiguiente, es de esperar que los Abs anti-PVRIG muestren inhibición de la activación de células T.

Ejemplo 18: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T usando células ectópicas que expresan PVRL2.

Se usa un ensayo basado en células para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T, la proliferación y la secreción de citoquinas. Se estimulan células T CD4 o CD8 en bruto humanas purificadas mediante co-cultivo con células estimuladoras CHO (células CHO que expresan anti-CD3 ligado a membrana) que expresan ectópicamente PVRL2 o vector vacío. Se evalúa la activación de células T mediante la expresión de marcadores de activación, p.ej., CD137, o mediante división celular evaluada a través de la dilución de colorante CFSE (las células T son marcadas con CFSE antes de su estimulación). También se determina la producción de citoquinas (p.ej., IFNγ, IL-2) como lectura adicional de la activación de células T. Se usan los marcadores de subtipo de células T para distinguir los efectos específicos sobre las células T CD4 o CD8. Es de esperar que los estimuladores CHO que expresan PVRL2 presenten un efecto estimulador ejemplo 19 basal sobre la activación de células T, mediado a través de DNAM1 endógena – un receptor de contrapartida coestimulador conocido de PVRL2 en células T. En presencia de Abs antagonísticos anti-PVRIG, este efecto basal estimulador de PVRL2 expresada superficialmente es de esperar que se vea potenciado adicionalmente, debido a su bloqueo de la influencia inhibidora de la PVRIG endógena sobre la activación de células T. Por consiguiente, es de esperar que los Abs anti-PVRIG agonísticos muestren inhibición de la activación de células T.

Ejemplo 20: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T usando el ensayo SEB

Los anticuerpos anti-PVRIG son evaluados para determinar su efecto sobre la actividad de células T usando células sanguíneas de voluntarios sanos y el superantígeno SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus*) para enfrentar y activar todas las células T que expresan la cadena de receptor de células T Vβ3 y Vβ8. Se cultivan PBMCs humanas en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se pre-incuban durante 30-60 minutos con los anticuerpos evaluados. A continuación se añade SEB en diferentes concentraciones, que oscilan entre 10 ng/mL y 10 µg/mL. Se recogen los sobrenadantes después de 2 a 4 días de cultivo y la cantidad de citoquinas producidas (p.ej., IL-2, IFNγ) se cuantifica mediante ELISA o usando un kit CBA estándar. La SEB estimula la producción de citoquinas por parte de las células sanguíneas enteras de un modo dependiente de la dosis. El efecto de los mAbs anti-PVRIG sobre la producción de citoquinas es evaluados para varias dosis de Ab. Es de esperar que los mAbs anti-PVRIG bloqueantes potencien la producción de IL-2 sobre el control de IgG. Además de IL-2, en este ensayo se puede evaluar el efecto de los Abs sobre los niveles de otras citoquinas, tal como TNFα, IL-17, IL-7, IL-6 e IFNγ, usando un kit CBA.

Ejemplo 21: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG en ensayos específicos de Ag

Un ensayo usado para obtener el perfil del efecto funcional de los anticuerpos anti-PVRIG humana sobre la estimulación específica de Ag de células T de memoria pre-existentes en sangre de donante sano es el ensayo de toxoide del tétanos (TT). Para este fin, se llevan a placa PBMC recién preparadas (2 x 10^5 células) en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio RPMI 1640 completo (que contiene un 5% de suero humano inactivado térmicamente), se pre-incuban con los anticuerpos evaluados a concentración variable y se estimulan con TT (Astarte Biologics) en una concentración de 100 ng/mL. Las células son incubadas durante 3-7 días a 37ºC, tras lo cual se

recolectan los sobrenadantes. Se determinan las concentraciones de citoquinas (p.ej., IL-2, IFN-γ) mediante ELISA y/o kit CBA. Es de esperar que los Abs anti-PVRIG bloqueantes potencien la proliferación de células T y la producción de citoquinas en comparación con los resultados obtenidos solo con el antígeno TT.

De forma similar al método descrito anteriormente, que usa TT para estimular células T de memoria humanas, podemos evaluar el efecto de Abs anti-PVRIG sobre la activación de células T tras respuestas de recuerdo a antígenos adicionales, tal como CMV, EBV, gripe, VIH, paperas y TB, usando un experimento similar al descrito anteriormente. Esto también puede usarse para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la estimulación de células vírgenes usando neo-antígenos tales como KLH.

Adicionalmente, se evalúa el efecto de los Abs anti-PVRIG sobre las respuestas específicas de antígeno de células T CD8 específicas de Ag clasificadas por tetrámero de sangre periférica de pacientes que padecen infecciones víricas tales como HCV y VIH. Las células T CD8 clasificadas por tetrámero son co-cultivadas con PBMCs autólogas cargadas de péptidos durante 5 días. Se evalúa la proliferación de células T específicas de Ag CD8 y la secreción de citoquinas (p.ej., IFNγ, IL2, TNF-α). Esperamos que los anticuerpos anti-PVRIG potencien la proliferación y la producción de citoquinas, en comparación con el antígeno solo.

Ejemplo 22: Análisis de unión y funcional de anticuerpos derivados de hibridoma contra PVRIG

Este ejemplo muestra la caracterización de la unión de anticuerpos derivados de hibridoma (los anticuerpos CHA) a proteína PVRIG humana y de cynomolgus en líneas celulares y leucocitos primarios, así como la caracterización de la capacidad de los anticuerpos derivados de hibridoma para bloquear la interacción entre PVRIG y PVRL2.

Protocolos

Análisis FACS de células que sobre-expresan hPVRIG: Se usaron las siguientes líneas celulares para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-PVRIG humana: HEK progenitoras y células HEK que sobre-expresan hPVRIG. Estas células fueron cultivadas en DMEM (Gibco) + 10% de suero fetal de ternero (Gibco) + glutamax (Gibco). Para las células HEK sobre-expresadoras de hPVRIG, también se añadió 0,5 µg/mL de puromicina (Gibco) al medio para selección positiva. Para el análisis FACS, se recolectaron todas las líneas celulares en fase de crecimiento logarítmico y se sembraron 50.000 – 100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-PVRIG humana (mIgG1 o mIgG2a) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como una serie de valoración de 8 puntos comenzando a 10 µg/mL en hielo durante 30 min – 1 h. La serie de valoración se llevó a cabo como diluciones en serie 1:3 o 1:3,3. Los datos fueron adquiridos usando un FACS Canto II (BD Biosciences) o IntelliCyt (IntelliCyt Corporation) y se analizaron usando software FlowJo (Treestar) y Prism (Graphpad).

Análisis FACS de líneas celulares humanas para hPVRIG: se usaron las siguientes líneas celulares para determinar la expresión y la especificidad de los anticuerpos anti-PVRIG humana: Jurkat y HepG2. Las células Jurkat fueron cultivadas en medio RPMI + 10% de suero fetal de ternero, glutamax, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato sódico (Gibco) y penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células HepG2 fueron cultivadas en DMEM + 10% de suero fetal de ternero + glutamax. Para el análisis FACS todas las líneas celulares fueron recolectadas en fase de crecimiento logarítmico y se sembraron 50.000 – 100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron los anticuerpos anti-PVRIG humana (mIgG1 o mIgG2a) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como series de valoración de 8 puntos comenzando a 10 µg/mL en hielo durante 30 minutos – 1 hora. Las series de valoración se llevaron a cabo como diluciones en serie 1:3 o 1:3,3. Los datos fueron adquiridos usando un FACS Canto II o IntelliCyte y se analizaron usando software FlowJo y Prism.

Análisis FACS de leucocitos primarios humanos vírgenes para hPVRIG: Se obtuvieron leucocitos primarios mediante aislamiento de gradiente Ficoll (GE Healthcare) de sangre periférica (Standford Blood Bank). Los leucocitos aislados como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron congelados en nitrógeno líquido con una densidad de entre 1 x 10^7 y 5 x 10^7 células/mL en una mezcla de 10% de DMSO (Sigma) y 90% de suero fetal de ternero. Para determinar la expresión de proteína de PVRIG en PBMC, se diseñaron cócteles de anticuerpos para los subconjuntos inmunes principales que incluyeron los anticuerpos anti-PVRIG. Se añadieron los anticuerpos anti-PVRIG humana (mIgG1 o mIgG2a) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o en algunos casos, como series de valoración de 4 puntos comenzando a 10 µg/mL en hielo durante 30 minutos – 1 hora.

Resumidamente, se añadieron mezclas de cóctel de anticuerpos a PBMC resucitados que fueron sembrados a 5x10^5 – 1x10^6 células/pocillo tras un bloqueo previo de receptor de Fc y tinción vivo/muerto (Aqua Live/Dead, Life Technologies). Los cócteles de anticuerpos fueron incubados con PBMC durante 30 minutos – 1 hora en hielo. A continuación las PBMC fueron lavadas y se adquirieron los datos mediante FACS usando un FACS Canto II. Los datos se analizaron usando software FlowJo y Prism. Los subconjuntos inmunes que fueron analizados incluyeron células NK CD56 dim, células NK CD56 bright, células T CD4+, células T CD8+, células T no convencionales (p.ej., células NKT y células T γδ), células B y monocitos.

Análisis FACS de células modificadas sobre-expresadoras de PVRIG de cynomolgus: Se usaron las siguientes líneas celulares para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-PVRIG humana con PVRIG de cynomolgus (cPVRIG): células expi progenitoras y células expi sobre-expresadoras de cPVRIG. Estas células fueron cultivadas en

DMEM + 10% de suero fetal de ternero + glutamax. Se generaron células expi sobre-expresadoras de cPVRIG transitorias electroporando ADN de cPVRIG en células expi progenitoras usando el sistema de transfección Neon. Para el análisis FACS, se usaron células expi cPVRIG entre 1-3 días después de la transfección. Las células expi progenitoras fueron recolectadas en la fase de crecimiento logarítmico. Se sembraron 50.000 – 100.000 células por pocillo de cada tipo en placas de 96 pocillos. Se añadieron los anticuerpos anti-PVRIG humana (mIgG1 o mIgG2a) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como una serie de valoraciones de 8 puntos comenzando en 10 µg/mL en hielo durante 30 minutos – 1 hora. La serie de valoraciones se llevó a cabo con diluciones en serie de 1:3 o 1:3,3. Los datos fueron adquiridos usando un FACS Canto II o IntelliCyte y se analizaron usando software FlowJo y Prism.

Análisis FACS de leucocitos de mono cynomolgus primarios vírgenes: Se obtuvieron leucocitos de mono cynomolgus (cyno) primarios a partir de sangre fresca, extraída no más de 24 horas antes del análisis de expresión. La sangre se obtuvo de Bioreclamation. Para determinar la expresión de proteína de PVRIG en PBMC cyno, se diseñaron cócteles de anticuerpos para los principales subconjuntos inmunes, que incluyeron los anticuerpos anti-PVRIG humana. Se añadieron los anticuerpos anti-PVRIG humana (mIgG1 o mIgG2a) y sus respectivos controles en diluciones de punto único (5 µg/mL), o como una serie de valoraciones de 8 puntos comenzando en 10 µg/mL en hielo durante 30 minutos – 1 hora.

Resumidamente, se añadieron mezclas de cóctel de anticuerpos a PBMC que fueron sembrados a $5x10^5$ – $1x10^6$ células/pocillo tras un bloqueo previo de receptor de Fc y tinción vivo/muerto. Los cócteles de anticuerpos fueron incubados con PBMC durante 30 minutos – 1 hora en hielo. A continuación las PBMC fueron lavadas y se adquirieron los datos mediante FACS usando un FACS Canto II. Los datos se analizaron usando software Prism. Los subconjuntos inmunes que fueron analizados incluyen linfocitos CD16+, monocitos/células mieloides CD14+/CD56+, y células T CD3+.

Ensayos de competición basados en células: Se evaluó la capacidad de los anticuerpos de PVRIG para inhibir la interacción de PVRIG con su ligando PVRL2 en un ensayo de competición celular. En este ensayo, el ligando PVRL2 es expresado endógenamente en células HEK no manipuladas y se añade PVRIG marcada con Fc soluble (fabricada a demanda por GenScript). En este caso, se determinó la capacidad de los anticuerpos de PVRIG para bloquear la unión de PVRIG soluble a células HEK a través de la adición concomitante de proteína PVRIG soluble 33 nM y anticuerpos de PVRIG (0,066-66 nM) a 100.000 células HEK y se incubó durante 1 hora en hielo. Se detectó el grado de unión de PVRIG Fc mediante la adición de anti-Fc humano Alexa 647 (Jackson Laboratories) durante 20-30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces en PBS para adquisición usando un FACS Canto II. Los datos fueron analizados usando FlowJob (Treestar), Excel (Microsoft) y Prism (GraphPad).

Resultados

Los anticuerpos de PVRIG de hibridoma reconocen PVRIG en células sobre-expresadoras: Para realizar un cribado de anticuerpos que fueran específicos para PVRIG, se determinó la capacidad de los anticuerpos generados a partir de dos campañas de hibridomas para unirse a líneas de células HEK modificadas para sobre-expresar PVRIG humana. La mayoría de los anticuerpos de dichas campañas se unieron a las células HEK hPVRIG, aunque con afinidad variable. Además, la mayoría de estos anticuerpos también mostró una baja unión de fondo a las líneas de células HEK progenitoras, lo que indica una alta especificidad hacia la PVRIG. La Figura 77 muestra un ejemplo de la especificidad de los anticuerpos de PVRIG. En la Figura 79 se muestra un resumen de todas las características de unión de los anticuerpos hacia células HEK hPVRIG respecto al control que fueron generados en las campañas de hibridomas.

Los anticuerpos de PVRIG reconocen la proteína PVRIG en células NK y T vírgenes: Las poblaciones que mostraron el mayor nivel de PVRIG en subconjuntos de PBMC vírgenes fueron las células NK y T CD8, y el nivel absoluto de expresión entre estos dos subconjuntos de células fue similar (gMFI). Las células T CD4 mostraron niveles menores de PVRIG, mientras que las células B y los monocitos presentaron una expresión muy baja/no detectable. En la Figura 91 se muestra un resumen de la expresión en células NK y en células T CD8 vírgenes, detectada por los anticuerpos. Otros subconjuntos menores también mostraron expresión de PVRIG e incluyeron células T no convencionales tales como células NKT y células T γδ. El patrón de expresión en subconjuntos de PBMC fue muy similar en todos los donantes analizados.

La PVRIG es detectada en líneas celulares Jurkat mediante anticuerpos de PVRIG derivados de hibridoma: Además del cribado de PBMC en función de la expresión de proteína PVRIG, quisimos comprender si también era expresada en líneas de células de cáncer. Elegimos para el cribado de nuestros anticuerpos células Jurkat, dada su elevada expresión de ARN de PVRIG. También elegimos HepG2 como línea celular de control negativo para validar adicionalmente la especificidad de nuestros anticuerpos. La mayoría de los anticuerpos derivados de hibridoma detectaron la expresión de proteína PVRIG en células Jurkat (Figura 79). Características de unión de anticuerpo de hibridoma de PVRIG a PBMC humanas primarias, células sobre-expresadoras cyno, y PBMC cyno primarias. Expi cyno OE denota células expi transfectadas transitoriamente con cPVRIG, expi par denota células expi progenitoras. gMFIr indica la tasa de diferencia en MFI geométrica de la tinción de anticuerpos de PVRIG respecto a sus controles. Las concentraciones indican aquella a la que se calculó la gMFIr. No evaluado indica anticuerpos que no fueron evaluados debido a una ausencia de unión a HEK hPVRIG, células expi cPVRIG, o no que cumplen los requisitos de

subconjuntos PBMC. Los anticuerpos destacados son cuatro anticuerpos para los cuales se realizó la humanización (Ver Figura 90).

Figura 92), pero no las células HepG2 (datos no mostrados). Un ejemplo de detección de PVRIG en Jurkat se muestra en la Figura 78 con un anticuerpo representativo, el CHA.7.518.

Ensayos bioquímicos basados en células: tras realizar el cribado de nuestros 29 anticuerpos de hibridoma en los ensayos bioquímicos celulares, descubrimos que había 20 bloqueantes claros y 9 no bloqueantes de la interacción PVRIG-PVRL2. Todos los anticuerpos bloqueantes fueron capaces de inhibir la interacción de PVRIG Fc con células HEK en al menos un 50%, eliminando por completo la mayoría de dichos anticuerpos la unión a PVRIG Fc. Los valores IC_{50} asociados a dichos anticuerpos que mostraron capacidad de bloqueo se presentan en la Figura 92. La mayoría de los valores de IC_{50} estaban entre 20-60 nM.

Resumen y conclusiones

Mediante el uso de una plataforma de hibridomas, hemos sido capaces de generar con éxito anticuerpos monoclonales para el antígeno PVRIG humano. Mediante el uso de células modificadas sobre-expresadoras como representantes de líneas celulares de cáncer, demostramos que nuestros anticuerpos son altamente específicos para el antígeno PVRIG, y son capaces de detectar la expresión de proteína que se correlaciona con la expresión de ARN. Tras análisis de subconjuntos de PBMC humanas, demostramos que la proteína PVRIG se expresa en su mayor nivel en células NK y T, con una expresión baja/negativa en células B y células mieloides. También demostramos que una proporción de dichos anticuerpos reaccionan de forma cruzada con el antígeno de PVRIG de mono cynomolgus (cyno) a través de la determinación de su unión a células sobre-expresadoras. Además, el patrón de expresión en PBMC de cyno es similar al de PBMC humanas. Finalmente, fuimos capaces de demostrar a través de un ensayo competitivo basado en FACS que una proporción de nuestros anticuerpos de hibridoma son capaces de inhibir la interacción de PVRIG con su ligando, PVRL2. Los anticuerpos que mostraron las mejores características respecto a todos los datos mencionados anteriormente fueron CHA-7-518, CHA-7-524, CHA-7-530 y CHA-7-538.

Ejemplo 23: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG CHA en el ensayo MLR

Un ensayo usado para obtener el perfil del efecto funcional de los anticuerpos anti-PVRIG humana sobre las respuestas de alo-antígeno es la proliferación de células T CD8+ humanas en un ensayo de Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR). Como es sabido en la técnica, MLR es un ensayo inmune celular *ex vivo* que proporciona una correlación *in vitro* de la función de células T.

Es de esperar que los anticuerpos anti-PVRIG potencien la proliferación de células T CD4 y CD8 en respuesta a las células de un donante de MHC no coincidente. Las células T humanas son enriquecidas a partir de sangre entera de un donante (p.ej., donante A) usando un “Human T cell RosetteSep RTM” (StemCell Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la separación, las células son marcadas fluorescentemente con colorante CFSE (Molecular Probes). Para actuar como células presentadoras de antígeno alogénicas (APCs), en primer lugar se aíslan células mononucleares a partir de sangre entera de un donante de MHC no coincidente (p.ej., donante B) y a continuación se agotan de células T CD3+. A continuación se irradian las APCs con 2500 rads en un irradiador de cesio.

En general, un ensayo MLR se lleva a cabo de la siguiente forma. Se co-cultivan células T humanas y 150.000 APCs alogénicas en una placa de 96 pocillos de fondo plano con 150.000 células T CD8+ y APCs durante 5 días con anticuerpos anti-PVRIG a diferentes concentraciones. En el día 5, las células son recolectadas, lavadas y teñidas con anti-CD8-biotina seguido de estreptavidina-PerCp. Las muestras son analizadas mediante FACS para determinar el grado de proliferación representado por la dilución de CFSE. Es de esperar que los anticuerpos anti-PVRIG bloqueantes funcionales potencien la proliferación de células T y la secreción de citoquinas en respuesta a las células de un donante de MHC no coincidente.

El ensayo MLR se usa para caracterizar el efecto bioquímico de los anticuerpos CHA de la invención en células T humanas en reposo y activadas, y para caracterizar la capacidad de los anticuerpos derivados de hibridoma para modular la proliferación de células T en un experimento MLR.

Protocolos

Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR): Se estableció una reacción de linfocitos mixtos co-cultivando células dendríticas (DCs) y células T derivadas de donantes distintos en un experimento alogénico. Las DCs fueron generadas cultivando monocitos purificados con 100 ng/mL de GM-CSF (R&D systems) y 100 ng/mL de IL-4 (R&D systems) durante 7 días. Después de 7 días, las células T CD3 marcadas con CFSE fueron combinadas con DCs en una proporción de 10:1 y se cultivaron en medio libre de suero X vivo-20 (Lonza) durante 5 días. En algunas condiciones, se añadieron anticuerpos anti-PVRIG no conjugados o anticuerpos de control de isotipo a las placas a 10 µg/mL. Se establecieron tres permutaciones de ensayo MLR, donde las DCs de un donante fueron co-cultivadas con células T CD3 de 3 donantes alogénicos separados. Todos los productos sanguíneos fueron adquiridos en el “Stanford Blood Bank”.

Análisis de expresión y funcional: Después del día 5 de cultivo MLR, se determinó el nivel y el grado de activación y proliferación de células T mediante dilución CFSE y expresión de marcadores de activación tales como CD25 y PD-1. Se usaron anticuerpos anti-PVRIG caseros de campañas de fagos y de hibridomas para determinar la expresión de PVRIG. También se evaluó la expresión del ligando de PVRIG, PVRL2, de un modo cinético sobre DC. Todos los datos fueron adquiridos usando citometría de flujo y el análisis de datos se llevó a cabo usando software FlowJo (Treestar) y Prism (Graphpad).

Análisis de epítopo basado en FACS: Como evaluamos un conjunto de anticuerpos en la MLR, nos interesó determinar si dichos anticuerpos podrían agruparse en "contenedores" de epítopos en base a la unión basada en FACS, y si dichos "contenedores" se correlacionarían con cambios en la activación y proliferación de células T en el ensayo. Para hacer esto, se pre-incubaron células T recolectadas del ensayo con anticuerpos de PVRIG no conjugados, y a continuación se contra-tiñeron con un anticuerpo de PVRIG conjugado de un clon diferente. El grado en el que el anticuerpo de PVRIG conjugado proporcionó una señal en las células T indicó el grado en el que dicho anticuerpo tenía que competir para la unión de PVRIG en células T con el anticuerpo no conjugado. Una señal negativa o baja indicaría que existe una fuerte competencia, lo que indica que los dos anticuerpos están en el mismo "contenedor" de epítopo. Una señal elevada indicaría una competencia baja o nula, y por tanto los anticuerpos serían considerados en diferentes "contenedores".

Resultados

Expresión de PVRL2 en DC derivadas de monocitos: Para determinar si PVRL2 sería expresada en DC del ensayo MLR, se generaron DC a partir de monocitos, y se determinó la expresión de PVRL2 de un modo cinético a intervalos diarios tras la adición de GM-CSF e IL-4. Tal como se indica en la Figura 72, la expresión de PVRL2 aumentó desde el Día 0 hasta el Día 5, cuando alcanzó un máximo. En el Día 6, la expresión disminuyó ligeramente en comparación con el Día 5. En el Día 7, la expresión fue similar al Día 6, lo que indica una estabilización de la expresión de PVRL2 para esos tiempos. Por tanto, las DC expresaron PVRL2 en el tiempo apropiado para su uso en el ensayo MLR.

Expresión de PVRIG en células T después de cultivo de MLR: Muchos receptores de células T que modulan la función en el MLR se expresan en células T en proliferación. Por tanto, quisimos determinar si también se expresa PVRIG. Analizamos células T en proliferación en el Día 5 después del inicio del co-cultivo de MLR y se caracterización mediante su dilución de CFSE (es decir, CFSE bajo). Tal como se muestra en la Figura 73 y la Figura 74, respecto al control de isotipo (mIgG1), se expresó PVRIG en células de bajo CFSE, determinado a través de múltiples anticuerpos de PVRIG tanto en células T CD4 como células T CD8 a lo largo de los tres donantes analizados. En la Figura 73 se muestran representaciones de FACS para indicar la PVRIG en células de CFSE bajo, y los gráficos de barras de la Figura 74 indican el nivel de expresión de PVRIG respecto a mIgG1.

Los anticuerpos de PVRIG potencian la proliferación de células T: habiendo demostrado que la expresión de PVRIG se expresa en células T en proliferación en la MLR, quisimos determinar si el tratamiento con anticuerpos de PVRIG podría afectar a los niveles de proliferación de células T. Tal como se muestra en la Figura 4, la adición de anticuerpos de PVRIG podría afectar a los niveles de proliferación de células T. Tal como se muestra en la Figura 4, la adición de anticuerpos de PVRIG en el ensayo de MLR fue capaz de aumentar el porcentaje de células de CFSE bajo con todos los anticuerpos de hibridoma evaluados en comparación con el control. Esto se observó para todos los donantes analizados.

Los anticuerpos de PVRIG se unen a epítopos múltiples de la PVRIG: Para comparar los anticuerpos de PVRIG en términos de capacidad de unión a diferentes epítopos de la PVRIG, llevamos a cabo un experimento competitivo donde se cultivaron células T del MLR con anticuerpos anti-PVRIG no marcados derivados de nuestras campañas de hibridomas durante 5 días. A continuación se recolectaron las células T en el día 5 y se contra-tiñeron con un anticuerpo anti-PVRIG conjugado que se derivó de nuestra campaña de fagos (CPA.7.021). Tal como se muestra en la Figura 76, se observó una reducción completa, o casi completa, de la unión de CPA.7.021 en las condiciones que contenían CHA.7.516-M1, CHA.7.518-M1, CHA.7.524-M1, CHA.7.530-M1 y CHA.7.538-M1 en comparación con los niveles de fluorescencia de fondo, lo que sugiere que dichos anticuerpos pueden solaparse en el reconocimiento de epítopos. Se observó una reducción parcial en la unión de CPA.7.021 con CHA.7.537-M1, CHA.7.528-M1 y CHA.7.548-M1, lo que sugiere un solapamiento parcial en el reconocimiento de epítopos. No se observó una reducción en la unión a CPA.7.021 en células pre-cultivadas con CHA.7.543-M1 lo que sugiere una ausencia de reconocimiento de epítopos. Colectivamente, estos datos indican que los anticuerpos de PVRIG de nuestras campañas, cuando se evalúan respecto a CPA.7.021, pudieron reconocer al menos 3 epítopos diferentes en la PVRIG.

Conclusiones: Caracterizamos nuestros anticuerpos de PVRIG en función de su capacidad para unirse a células T en proliferación y en reposo, así como en función de su actividad funcional en una MLR. Se detectó la unión de múltiples anticuerpos de PVRIG en células T en proliferación y fue mayor en células T en proliferación en comparación con las de reposo, especialmente el subconjunto CD8+. Estos datos demuestran que la expresión de PVRIG aumenta con la activación de células T. Además, varios anticuerpos de PVRIG aumentaron la proliferación de células T en comparación con el isotipo mIgG1 lo que indica que también pueden modular la función de células T. Como antes, dichos anticuerpos presentan todos la capacidad de bloquear la unión de PVRIG con su ligando, PVRL2. En base a esto, concluimos que mediante el bloqueo de la interacción PVRIG-PVRL2, estos anticuerpos conducen a un aumento de la activación y proliferación de células T, que es un indicio clave de un efecto deseado para un inhibidor de punto

de control inmune que se usaría para tratar el cáncer. Finalmente, llevamos a cabo experimentos competitivos que comparan la unión de múltiples anticuerpos de PVRIG derivados de hibridomas a células T activadas, respecto a un anticuerpo derivado de fago. De esta serie de experimentos, proporcionamos evidencias de una diversidad de epítopos de nuestros anticuerpos derivados de fagos y de hibridomas.

Ejemplo 24: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T tras combinación con bloqueo de punto de control inmune

Es de esperar que la combinación de bloqueo de PVRIG con Abs bloqueantes de un punto de control inmune conocido (p.ej., PD1, PDL-1 o TIGIT) aumente el efecto estimulador sobre la activación de células T en los ensayos indicados anteriormente.

Ejemplo 25. Análisis funcional de anticuerpos de PVRIG

Los anticuerpos de PVRIG de la invención fueron caracterizados en términos de su capacidad para inhibir la interacción de PVRIG con su ligando PVRL2, y de su capacidad para modular la función efectora de linfocitos en ensayos basados en células primarias.

Protocolos

Ensayos bioquímicos basados en células

Se determina la capacidad de los anticuerpos anti-PVRIG para inhibir la interacción de PVRIG con su ligando PVRL2 en un formato de ensayo bioquímico celular en dos orientaciones.

En la primera orientación, se expresa endógenamente el ligando PVRL2 en células HEK no manipuladas y se añade PVRIG marcada con Fc biotinilada soluble (fabricada bajo demanda por Genscript). En este caso, se determinó la capacidad de los anticuerpos de PVRIG para bloquear la unión de PVRIG soluble a células HEK a través de dos permutaciones. En la primera permutación, se pre-incubaron varias concentraciones de anticuerpos de PVRI (rango 0,066-66 nM) con 33 nM de PVRIG soluble en salino tamponado con fosfato (PBS, Gibco) durante 30 minutos en hielo. Este complejo se añadió posteriormente a 100.000 células HEK y se incubó durante otra hora adicional en hielo. Después de 1 hora, las células HEK fueron lavadas dos veces en PBS y se detectó el grado de PVRIG soluble unida a células HEK mediante la adición de estreptavidina conjugada a Alexa 647 (Jackson Laboratories) durante 30 minutos en hielo. Las células HEK fueron lavadas dos veces en PBS, y resuspendidas en 100 µL de PBS para adquisición en el FACS Canto II (BD Biosciences). Los datos fueron analizados usando software FlowJo (Treestar) y Prism (Graphpad). En la segunda permutación, se añadió 33 nM de proteína PVRIG soluble y anticuerpos de PVRIG (0,066-66 nM) concomitantemente con 100.000 células HEK y se incubó durante 1 hora en hielo. Las siguientes etapas para el análisis de esta permutación son equivalentes a la primera permutación.

En la segunda orientación, se modificó las células HEK para sobre-expresar PVRIG y se añadió PVRL2 marcada con Fc biotinilada soluble (CD Biosciences). En este caso, se añadieron varias concentraciones de anticuerpos de PVRIG (rango 0-200 nM) con PVRL2 soluble 160 nM concomitantemente a 100.000 células HEK hPVRIG o células HEK progenitoras, y se incubó en PBS + 1% de BSA + 0,1 % de azida sódica (tampón de FACS) durante 1 h en hielo. La unión de PVRL2 soluble se detectó mediante la adición de estreptavidina Alexa 647 en tampón de FACS durante 30 minutos en hielo. Las células fueron lavadas dos veces en tampón de FACS, y re-suspendidas en 50 µL de PBS para adquisición en el HTFC Intellicyt (Intellicyt). Los datos se analizaron usando FlowJo (Treestar), Excel (Microsoft) y Prism (GraphPad).

Ensayo de células NK primarias

El subconjunto de PBMCs con el perfil de expresión más robusto para PVRIG fue sobre células NK. Como tal, diseñamos un ensayo de co-cultivo basado en células NK con células tumorales que expresan PVRL2 para determinar si nuestros anticuerpos podían modular la citotoxicidad mediada por células NK hacia dichas dianas. Las dianas elegidas fueron la línea celular de leucemia linfocítica de células B, Reh (banco de células ATCC), y la línea celular de leucemia mieloide aguda, MOLM-13 (banco celular DSMZ). Las células Reh y MOLM-13 fueron crecidas en medio RPMI (Gibco) + 20% de suero fetal de ternero (Gibco), glutamax (Gibco), penicilina/estreptomicina (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato sódico (Gibco), HEPES (Gibco) y beta-mercaptoetanol (Gibco).

Dos días antes del ensayo de co-cultivo, las células NK primarias fueron aisladas usando el kit de aislamiento de células NK humanas (Miltenyi Biotec) y se cultivaron en medio RPMI + 20% de suero fetal de ternero, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, HEPES, beta-mercaptoetanol y 250 U/mL de IL-2 (R&D systems). El día del ensayo, las células NK fueron recolectadas, enumeradas y pre-incubadas con anticuerpos de PVRIG durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. Durante esta incubación, las células diana fueron recolectadas del cultivo, etiquetadas con Calcein AM (Life Technologies) durante 30 min a 37ºC, se lavaron en el medio y se enumeraron para el ensayo. Se establecieron los ensayos de toxicidad mediados por células NK, donde se co-cultivó un número constante de células diana (50.000) con concentraciones crecientes de células NK pre-incubadas con 5 µg/mL de anticuerpos de PVRIG (alterando así la ratio de células NK a diana). Alternativamente, se usó una ratio de células NK a diana fija en el ensayo, pero las células NK fueron pre-incubadas con concentraciones

variables de anticuerpo de PVRIG (rango de 3,9 ng/mL – 5 ng/mL) en una valoración de dosis. Tras adición de las células NK y las dianas, las placas fueron sometidas a giros pulsados a 1.400 rpm durante 1 minuto y colocadas a 37ºC en una atmósfera con un 5% de CO_2 durante 4 horas. Después de 4 horas, las placas se giraron a 1.400 rpm durante 4 minutos, y se recolectaron 80 µL de sobrenadante para cuantificar la liberación de Calceína AM desde las células diana. La cantidad de Calceína AM liberada de las dianas se determinó mediante un fluorómetro Spectramax Gemini XS (Molecular Devices). Como controles para la liberación de Calceína AM, se determinó la liberación total y espontánea exponiendo a las células diana a etanol al 70% o a medio solo por toda la duración del ensayo. Los niveles de muerte (en porcentaje) por acción de las células NK se calcularon usando la siguiente fórmula:

(liberación de muestra – liberación espontánea) / (liberación total – liberación espontánea) * 100

Además de los anticuerpos de PVRIG, en algunos casos, también se añadieron como comparadores otros anticuerpos de receptores de células NK tales como TIGIT (Genentech, clon 10A7, número de patente: WO 2009126688 A2) y DNAM-1 (Biolegend, clon 11A8).

Resultados

Ensayos bioquímicos basados en células: Tras realizar el cribad de un panel de nuestros anticuerpos de PVRIG en los ensayos bioquímicos celulares, descubrimos que había niveles variables de inhibición en los anticuerpos evaluados, y que el nivel de inhibición era dependiente de la permutación y la orientación del ensayo (Figura 98). Para ilustrar este punto, se muestran específicamente cuatro anticuerpos en la Figura 93. La orientación y permutación del ensayo que proporcionó el efecto inhibidor más robusto respecto al control, fue cuando se añadió PVRIG soluble pre-incubada con anticuerpos de PVRIG a células HEK (Figura 93a). En esta permutación, el CPA.7.021 mostró la mejor capacidad de bloqueo absoluta en comparación con los otros tres anticuerpos (CPA.7.002, CPA.7.005 y CPA.7.050). A pesar de las diferencias en el nivel de bloqueo, todos los anticuerpos de esta permutación mostraron valores de IC_{50} similares, que estuvieron en el rango nanomolar bajo, y la capacidad de bloqueo alcanzó un valor estable a mayores concentraciones.

Cuando el nivel absoluto de inhibición invocado por los cuatro anticuerpos de PVRIG fue medido entonces, cuando la PVRIG soluble y los anticuerpos de PVRIG fueron añadidos concomitantemente a células HEK, más viabilidad del bloqueo se observó en el ensayo (Figura 93b). CPA.7.021 siguió siendo el mejor anticuerpo bloqueante. Sin embargo, CPA.7.002 y CPA.7.005 mostraron una capacidad marcadamente menor para inhibir la unión de PVRIG soluble a células HEK con respecto al anticuerpo de control. CPA.7.050 mostró un nivel intermedio de bloqueo en comparación con CPA.7.021, CPA.7.002 y CPA.7.005. Esta diferencia en el nivel absoluto de inhibición también correspondió a diferencias en los valores IC_{50} de cada anticuerpo. CPA.7.021 y CPA.7.050 mostraron nuevamente valores de IC_{50} nanomolares bajos, aunque fueron ambos mayores que en la primera permutación del ensayo. Por el contrario, los valores de IC50 de CPA.7.002 y CPA.7.005 aumentaron sustancialmente, CPA.7.002 en aproximadamente 20 veces, y CPA.7.005 en aproximadamente 30 veces. Estos datos indican cómo debe competir el anticuerpo por la unión a PVRIG con su ligando cognado, indicará la potencia con la que el anticuerpo puede bloquear dicha interacción.

Cuando se invirtió la orientación del ensayo bioquímico (es decir, se determina la unión de PVRL2Fc a células HEK hPVRIG), la capacidad de los cuatro anticuerpos de PVRIG para bloquear la interacción con PVRL2 Fc fue variable (Figura 93c). En consistencia con los ensayos bioquímicos que usaron células HEK como dianas (Figura 93a-b), CPA.7.021 y CPA.7.050 inhibieron la unión de PVRL2 Fc a células HEK PVRIG, y su capacidad para bloquear la unión fue similar. Sin embargo, sorprendentemente, observamos un aumento de la unión de PVRL2 Fc en presencia de los anticuerpos CPA.7.002 y CPA.7.005, que no observamos cuando se usaron células HEK como dianas.

Ensayo de citotoxicidad de células NK con células Reh: La primera diana que investigamos en el ensayo de citotoxicidad de células NK fue la línea Reh. Reh fue seleccionada inicialmente porque muestra niveles robustos de PVRL2 mediante citometría de flujo, pero una baja frecuencia de otros ligandos activantes tales como ligandos NKG2D, y una baja expresión de PVR (Figura 94). No se usaron las dianas de células NK tradicionales, tal como K562, debido a su expresión de una frecuencia elevada de ligandos NKG2D, y una alta expresión de PVR, que puede enmascarar un efecto funcional de los anticuerpos de PVRIG. Cabe destacar que las células Reh no expresaron ningún receptor de célula NK conocido por interaccionar con PVRL2 y PVR, tal como TIGIT, DNAM-1 y PVRIG.

Tras realizar un escrutinio de nuestro panel de anticuerpos de PVRIG en este ensayo, observamos cuatro anticuerpos que fueron capaces de modular la citotoxicidad mediada por células NK (Figura 99). Estos cuatro anticuerpos fueron los discutidos en la sección de resultados del ensayo bioquímico, CPA.7.002, CPA.7.005, CPA.7.021 y CPA.7.050. En todos los casos, la adición de estos anticuerpos potenció la citotoxicidad mediada por células NK contra células Reh (Figura 95a-c). La adición de CPA.7.002 y CPA.7.005 potenció la citotoxicidad de una forma más robusta (Figura 95a-b), seguidos de CPA.7.021 y CPA.7.050, que mostraron niveles similares de potenciamiento (Figura 95c). La Figura 95d muestra un análisis dependiente de la concentración del potenciamiento de la citotoxicidad mediada por células NK por parte de CPA.7.002 y CPA.7.021. Los anticuerpos de bloqueo para receptores que se ha publicado que también se unen a PVRL2, tal como TIGIT y DNAM-1, fueron añadidos al ensayo con células Reh como comparadores. Tal como se muestra en la Figura 95e-f, la adición de anticuerpos de TIGIT y DNAM-1 no mostró efectos funcionales en este ensayo.

Ensayo de células NK con células MOLM-13: para determinar si los anticuerpos de PVRIG eran capaces de modular la citotoxicidad mediada por células NK contra una segunda diana, se utilizaron células MOLM-13. Las MOLM-13 también expresan PVRL2 de forma análoga a las células Reh, pero también presentan una expresión robusta de PVR (Figura 94). Como las células Reh, las MOLM-13 no expresaron ningún receptor de células NK. La utilización de esta línea celular, además de las células Reh, indicaría si los anticuerpos de PVRIG pueden modular la citotoxicidad mediada por células NK en el contexto de diferentes interacciones receptor-ligando, particularmente cuando se expresa PVR.

Tras cribar nuestros anticuerpos de PVRIG en este ensayo, encontramos que el efecto funcional de CPA.7.021 estaba disminuido y no mostró ningún cambio significativo de la citotoxicidad mediada por células NK por encima de los niveles de control (Figura 97a). Por el contrario, CPA.7.002 y CPA.7.005 fueron capaces de potenciar la citotoxicidad mediada por células NK en este ensayo (Figura 97a). Usando un anticuerpo comparador, el bloqueo de TIGIT no mostró efectos funcionales en este ensayo en comparación con el control (Figura 97b).

Resumen y conclusiones

Usando nuestra plataforma de fagos de anticuerpos, generamos un panel de anticuerpos contra el antígeno PVRIG humano que mostró la capacidad de bloquear la interacción de PVRIG con su ligando PVRL2, y de potenciar la citotoxicidad mediada por células NK contra dos líneas celulares hematológicas. La capacidad de los anticuerpos de PVRIG para inhibir la interacción entre PVRIG y PVRL2 se vio influida por la orientación del ensayo, así como por las etapas de pre-incubación, representativas de la dinámica potencial de anticuerpos con PVRIG en experimentos fisiológicos tales como el cáncer. Cuatro anticuerpos mostraron la capacidad de potenciar la citotoxicidad mediada por células NK contra la línea celular Reh, pero solo dos anticuerpos mostraron la capacidad de potenciar la citotoxicidad contra las células MOLM-13. Esta diferencia puede atribuirse a las interacciones receptor-ligando alternativas implicadas en el reconocimiento mediado por células NK de cada línea celular, y/o a propiedades diferenciales de los anticuerpos y su potencia para modular la función de PVRIG.

Ejemplo 26: Efecto de anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T GD usando células que expresan PVRL2 ectópicamente o de forma natural

Se usó un ensayo basado en células para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T gamma delta, la proliferación y la secreción de citoquinas. Las células T gamma delta humanas purificadas son activadas con HMBPP o IPP y co-cultivadas con células diana (p.ej., REH, MOLM-13), que expresan de forma natural PVRL2, o con células diana que expresan ectópicamente PVRL2 o vector vacío (p.ej., CHO, Raji, 721.221). Se determina la función de células T gamma delta examinando la producción de citoquinas (p.ej., IFN-γ, IL-17), en sobrenadantes cultivados, o la actividad citotóxica sobre las células diana. Es de esperar que la expresión de PVLR2 tenga un efecto estimulador basal sobre la activación de células T gamma delta, mediada a través de DNAM1 endógena, un receptor de contrapartida coestimuladora conocido de la PVRL2 en células T gamma delta. En presencia de Abs anti-PVRIG antagonistas, es de esperar que la producción de citoquinas o la actividad de citoquinas se vea potenciada adicionalmente, debido a su bloqueo de la función inhibidora de la PVRIG endógena sobre la activación de células T gamma delta. Por consiguiente, es de esperar que los Abs anti-PVRIG agonistas muestren inhibición de la activación de células T gamma delta.

Ejemplo 27: Efecto de proteínas en células T humanas activadas usando anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de PBMCs autólogas

Materiales y Métodos

En estos experimentos se evalúan los efectos de la PVRIG en células T humanas que fueron activadas usando anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de PBMCs autólogas. Y a la inversa, este ensayo también puede usarse para evaluar los efectos de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la activación de células T.

La proteína de fusión PVRIG hECD-hIg (Figura 92BA), compuesta del ECD de PVRIG humana fusionado al Fc de la IgG1 humana que porta las mutaciones C220, C226 y C229 a S en la bisagra, fue producida en GenScript (China) mediante transfección transitoria en células CHO-3E7 que fueron cultivadas durante 6 días, seguido de purificación de proteína A de la cosecha celular. El producto final se formuló en PBS, pH 7,2. Se usó el vector de expresión Vector de Expresión de Mamífero pTT5, en el que el gen de PVRIG está gobernado por el promotor CMV.

El kit de aislamiento de células T humanas CD4+ se adquirió de Miltenyi (cat nº 130-094-131). El control de hIgG1 (Synagis®) se obtuvo de Medimmune Inc. El Ab anti-CD3 humano (OKT3, cat nº 16-0037) y el Ab anti-CD28 humano (clon CD28. 2; cat nº 16-0289) se compraron a eBioscience. Las Dynabeads M-450 Epoxy (cat nº 140. 11) se compraron a Invitrogen. Las capas leuco-plaquetarias de sangre humana se obtuvieron de LifeSource. Ficoll-Paque Plus (cat nº 17-1440-02) se compró a GE HealthCare.

Aislamiento de PBMCs a partir de capas leuco-plaquetarias usando separación Ficoll: Las PBMCs totales se suspenden en medio ExVivo 20, y se irradian a 3000 rad. Se aíslan células T CD4+ vírgenes a partir de las capas leuco-plaquetarias de sangre de tres donantes sanos usando el kit II de aislamiento de células T humanas CD4+

(Miltenyi) según las instrucciones del fabricante y se co-cultivan con PBMCs autólogas irradiadas en una ratio de 1:1 (1,5 x 10^5 células T con 1,5 x 10^5 PBMCs irradiadas por pocillo). Los cultivos se activan con anticuerpos anti-CD3 (0,5 µg/mL) y anti-CD28 (0,5 µg/mL). Se añade anticuerpo anti-PVRIG o una proteína de ECD de PVRIG al cultivo en las concentraciones indicadas. Después de 24h de cultivo, las células son pulsadas con H3-timidina. Las células se recolectan después de 72 horas en cultivo.

Para el experimento de ECD, es de esperar que los resultados produzcan una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación y/o la activación de células T, apoyando el potencial terapéutico de los agentes terapéuticos basados en PVRIG inmunoinhibidores (p.ej., polipéptidos de PVRIG o proteínas de fusión de PVRIG según al menos algunas realizaciones de la invención) para tratar enfermedades autoinmunes gobernadas por células T, tal como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, soriasis y enfermedad inflamatoria del intestino, así como para tratar otras enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y/o para reducir la activación inmune no deseada que sigue a una terapia génica o celular. Esencialmente, las proteínas de PVRIG inmunoinhibidoras que agonizan PVRIG deberían prevenir o reducir la activación de células T y la producción de citoquinas proinflamatorias implicadas en la patología de enfermedad de dichas afecciones.

Adicionalmente, también es de esperar que estos resultados apoyen un potencial terapéutico de los anticuerpos anti-PVRIG inmunoestimuladores que reduzca la actividad inhibidora de la PVRIG para tratar afecciones que se beneficien de un aumento de las respuestas inmunes, tal como inmunoterapia de cáncer, enfermedades infecciosas, particularmente infecciones crónicas y sepsis. Esencialmente, los anticuerpos anti-PVRIG inmunoestimuladores promoverán la activación de células T y provocarán la producción de citoquinas pro-inflamatorias, promoviendo de este modo el agotamiento de células cancerosas o infectadas o de agentes infecciosos.

Ejemplo 28: Ensayo de inhibición de la activación de células T.

En estos experimentos, se evalúan los efectos de ECDs de PVRIG o de anticuerpos anti-PVRIG en la activación de células T en un ensayo de perlas.

Materiales y Métodos

Aislamiento de células T humanas: Se obtuvieron capas leuco-plaquetarias del “Stanford Blood Bank” de donantes humanos sanos. Se aislaron las células T CD3+ de las capas leuco-plaquetarias usando el kit RosetteSep (StemCell Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se analizan con anti-CD45 y anti-CD3 mediante citometría de flujo para evaluar el % de células CD3+ obtenidas. La viabilidad se evalúa después de descongelar antes del ensayo.

Recubrimiento de perlas y QC: Se recubren perlas activadas con tosilo (Invitrogen, cat nº 14013) a 500x10^6/mL con mAb anti-CD3 y con proteínas ECD de PVRIG o anticuerpos anti-PVRIG en un protocolo de dos etapas: con 50 µg/mL de clon UTCH1 anti-CD3 humano (R&D systems, cat nº mab 100) en tampón de fosfato sódico a 37ºC durante una noche, seguido de 0-320 µg/mL de proteínas ECD de PVRIG o de anticuerpos anti-PVRIG durante otra noche de incubación a 37ºC.

Se analiza la cantidad de proteína PVRIG (ya sea ECD o anticuerpo) unida a las perlas.

Experimento de ensayo de perlas: se cultivan 100k células T CD3+ humanas con 100k o 200k perlas recubiertas con diversas concentraciones de la proteína PVRIG durante 5 días en IMDM completo (Gibco, cat nº 12440-053) suplementado con un 2% de suero humano AB (Gibco, cat nº 34005-100), Glutamax (Gibco, cat nº 35050-061), piruvato sódico (Gibco, cat nº 11360-070), disolución MEM de aminoácidos no esenciales (Gibco, cat nº 11140-050) y 2-mercaptoetanol (Gibco, cat nº 21985). Al final del día 5 de cultivo, las células son teñidas con anti-CD25, anti-CD4, anti-CD8 y colorante vivo-muerto fijable para determinar los niveles de expresión de CD25 en cada subconjunto de células. Los sobrenadantes son recolectados y evaluados en términos de secreción de IFNγ mediante ELISA (Human INFγ duoset, R&D systems, DY285).

En estos experimentos, las células T CD3 humanas co-cultivadas con perlas recubiertas de concentraciones variables de proteína PVRIG son analizadas para determinar su nivel de expresión de CD25. Se anticipa que tanto las células CD4+ como las CD8+ muestren una inhibición dependiente de la dosis por parte de la proteína de fusión PVRIG-ECD, o, a la inversa, se anticipa que las células CD4+ y CD8+ muestren una activación dependiente de la dosis por parte del anticuerpo de PVRIG.

Ejemplo 29: Mapeado de epítopos de anticuerpos anti-PVRIG humana basado en reactividad cruzada con cynomolgus

Fundamentos y Objetivos

El objetivo de este estudio es identificar los epítopos de la proteína PVRIG que determinan la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-PVRIG humana con el ortólogo de mono cynomolgus (cyno). Muchos de los anticuerpos líderes contra la diana PVRIG humana muestran un grado variable de reactividad cruzada con cyno a pesar del hecho que muchos de estos anticuerpos pertenecen al mismo contenedor de epítopos. Para arrojar luz sobre el fundamento

molecular de la reactividad cruzada humano/cyno (o de su ausencia), se diseñaron varias mutaciones cyno-a-humano de las proteínas recombinantes de PVRIG, se expresaron y se purificaron, y se evaluaron en términos de unión a un panel de anticuerpos anti-PVRIG humana en ELISA.

Métodos

Diseño de variantes cyno-a-humano: el alineamiento de secuencia de dominios extracelulares (ECDs) de PVRIG humana y de cyno muestra un 90% de identidad de secuencia y un 93% de homología de secuencia entre los ortólogos humano y de cyno (Figura 100). En base a la naturaleza de las mutaciones (conservadas frente a no conservadas) y a la predicción de estructura secundaria (enrollada frente a extendida) de la región de mutación, se diseñaron tres mutantes sito-dirigidos de la PVRIG de cyno para testar el mapeado de epítopos enfocado a reactividad cruzada de cyno. Dichos mutantes incluyen H61R, P67S y L95R/T97I PVRIG de cyno. También se generó PVRIG natural humana y de cyno.

Expresión y purificación de PVRIG humana, de cyno, y de variantes híbridas: Todas las variantes de PVRIG fueron expresadas como fusiones ECD con una etiqueta C-terminal 6XHis en células de mamífero. Las proteínas fueron purificadas mediante purificación de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión de tamaño. Las proteínas purificadas fueron cambiadas de tampón a tampón de PBS (pH 7,4) y almacenadas a 4ºC.

ELISA para determinar la interacción PVRIG-anticuerpo: se llevó a cabo un ELISA funcional como se indica a continuación: proteínas recombinantes de cyno, humanas e híbridas cyno/humano (marcadas con His) fueron adsorbidas sobre una placa IA durante una noche a 4ºC. Los pocillos de placa recubiertos fueron lavados dos veces con PBS e incubados con 300 µL de tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente (RT) durante 1 h. Se retiró el tampón de bloqueo y las placas fueron lavadas dos veces más con PBS. Las variantes de PVRIG ligadas a placa fueron incubadas con mAbs anti-PVRIG humana (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 h. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS-T (PBS 7,4, 0,05% de Tween 20), después tres veces con PBS y se añadió 50 µL/pocillo de un anticuerpo secundario conjugado a HRP (específico de dominio Fc de IgG humana, Jackson ImmunoResearch). Se incubó a RT durante 1 h y se volvió a lavar las placas. Se desarrollaron las señales ELISA en todos los pocillos añadiendo 50 µL de sustrato Sureblue TMB (KPL Inc) e incubando durante 5-20 minutos. La reacción HRP se detuvo añadiendo 50 µL de H_2SO_4 2N (VWR) y se leyeron las señales de absorbancia a 450 nm 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

Los residuos S67, R95 e I97 como determinantes de la reactividad cruzada de cyno: Los datos de unión mostrados en la Figura 101 claramente muestran que los residuos S67, R95 e I97 afectan a 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 L95R/T97I cyno-a-humano mejora significativamente la unión de CPA.7.002, CPA.7.021, CPA.7.028 y CPA.7.041. Por otro lado, la mutación cyno-a-humano H61R no afecta a la unión de ninguno de los anticuerpos evaluados.

La unión relativa de las variantes cyno-a-humano sugiere tres grupos de epítopos: La unión relativa de los anticuerpos a las variantes cyno, humana e híbridas de PVRIG sugiere 3 grupos distintos de epítopos: 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 CPA.7.050). Los grupos de epítopos muestran una fuerte correlación con el grado de reactividad cruzada de dichos anticuerpos (Figura 102).

Resumen y Conclusiones

El mapeado de epítopos restringido basado en variaciones cyno-a-humano identificó los residuos de ECD de PVRIG S67, R95 e I97, como determinantes de la reactividad cruzada de cyno en anticuerpos anti-PVRIG humana. La restauración completa de la unión a PVRIG cyno L95R/T97I para los anticuerpos CPA.7.021 y CPA.7.028 y la unión mejorada de CPA.7.002 a este mutante sugiere rotundamente que los residuos R95 e I97 son epítopos críticos de PVRIG humana para dichos anticuerpos. Estos descubrimientos también sugieren una posible vía para predecir la reactividad cruzada con ortólogos de PVRIG de primates no humanos en base a su secuencia de aminoácidos primaria.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PVRIG (proteína que contiene dominio de inmunoglobulina relacionada con receptor del poliovirus) que comprende

i) el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1434 y

ii) el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 1453, para uso en el tratamiento del cáncer mediante la activación de células T en un paciente.

2**.** Un anticuerpo anti-PVRIG que comprende:

i) el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1447 y

ii) el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 1462,

para uso en el tratamiento del cáncer mediante la activación de células T en un paciente.

3. El anticuerpo anti-PVRIG para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dichas células T son células T citotóxicas (CTL).

4. El anticuerpo anti-PVRIG para uso según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas células T se seleccionan del grupo que consiste en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$.

5. El anticuerpo anti-PVRIG para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha activación se mide como un aumento en la producción de interferón-γ y/o un aumento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

6. El anticuerpo anti-PVRIG para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en 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 tiroideo, cáncer de testículos, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de célula escamosa y basal), glioma, cáncer renal (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de célula T (T-ALL), linfoma de célula B grande difusa, tumores de célula germinal testicular, mesotelioma y cáncer esofágico.B

7. Un anticuerpo anti-PVRIG que comprende:

i) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1434 y

ii) un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 1453.

8. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1434; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 1453.

9. Una composición de vector de expresión que comprende:

a) un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de la reivindicación 8; y

b) un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de la reivindicación 8.

10.Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de la reivindicación 8 y dicho segundo ácido nucleico de la reivindicación 8.

11. Una célula hospedante que comprende la composición de vector de expresión de la reivindicación 9 o 10.

12. Un método para obtener un anticuerpo anti-PVRIG que comprende:

a) cultivar la célula hospedante de la reivindicación 11 en condiciones en las que se expresa dicho anticuerpo; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

13. Un anticuerpo anti-PVRIG que comprende

i) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1447 y

ii) un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 1462.

14. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1447; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 1462.

15. Una composición de vector de expresión que comprende:

a) un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de la reivindicación 14; y

b) un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de la reivindicación 14.

16. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de la reivindicación 14 y dicho segundo ácido nucleico de la reivindicación 14.

17. Una célula hospedante que comprende la composición de vector de expresión de la reivindicación 15 o 16.

18. Un método para obtener un anticuerpo anti-PVRIG que comprende:

a) cultivar la célula hospedante de la reivindicación 17 en condiciones en las que se expresa dicho anticuerpo; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

Figura 1

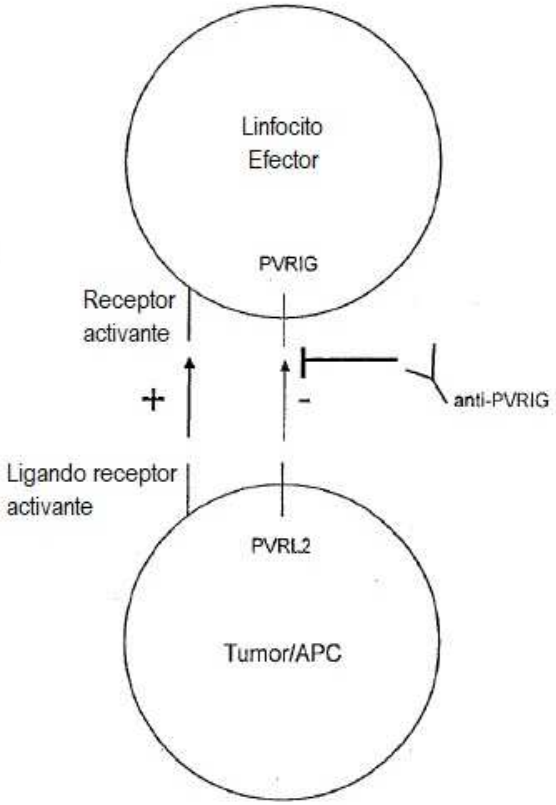

Linfocito
Efector
PVRIG
Receptor
activante
+
-
anti-PVRIG
Ligando receptor
activante
PVRL2
Tumor/APC

Figura 2

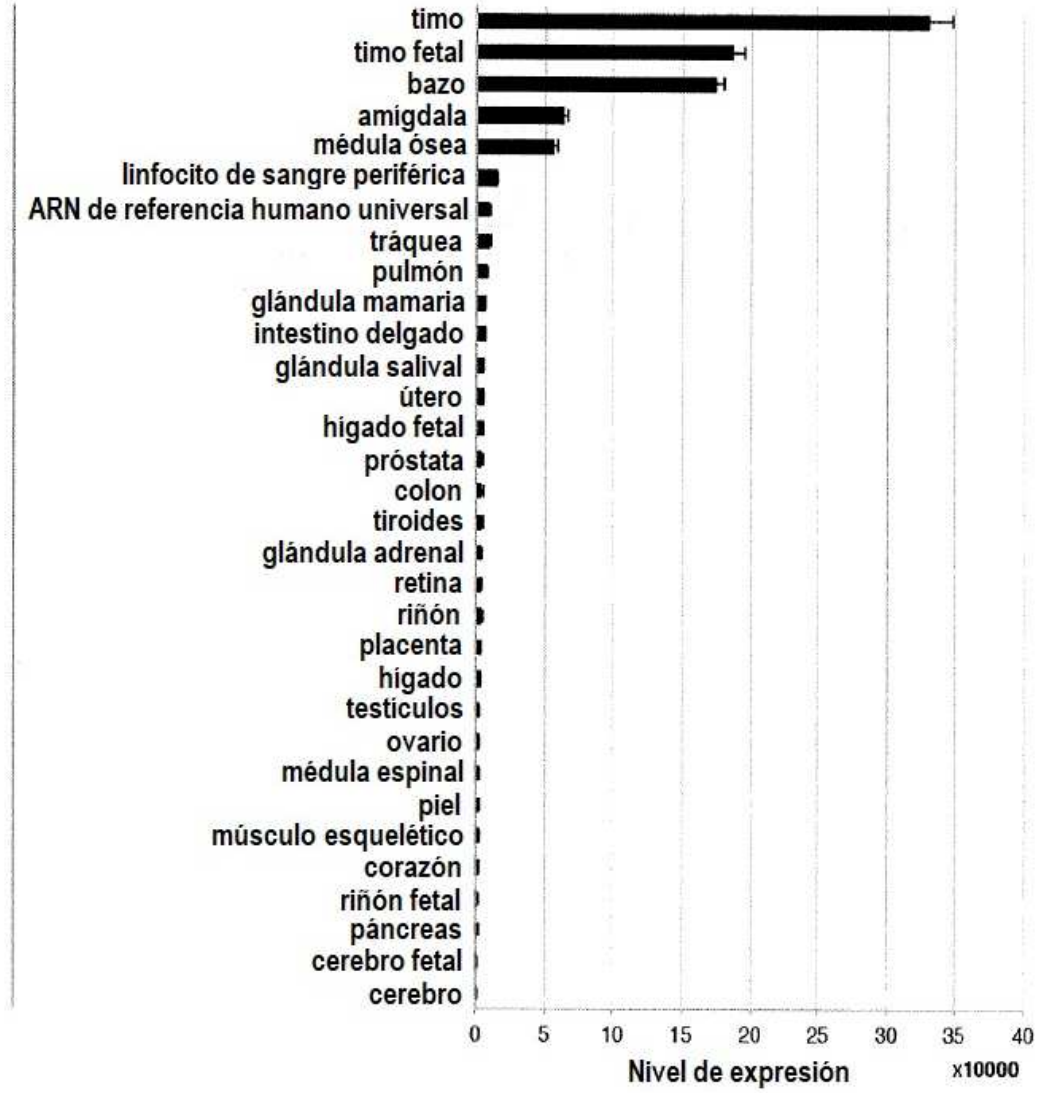

timo
timo fetal
bazo
amigdala
médula ósea
linfocito de sangre periférica
ARN de referencia humano universal
tráquea
pulmón
glándula mamaria
intestino delgado
glándula salival
útero
higado fetal
próstata
colon
tiroides
glándula adrenal
retina
riñón
placenta
hígado
testículos
ovario
médula espinal
piel
músculo esquelético
corazón
riñón fetal
páncreas
cerebro fetal
cerebro
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Nivel de expresión
x10000

Figura 3:

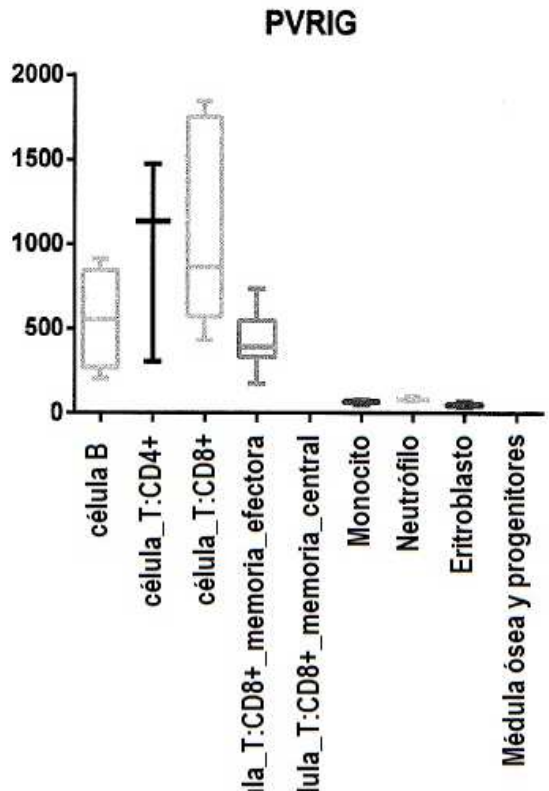

PVRIG
2000
1500
1000
500
0
célula B
célula_T:CD4+
célula_T:CD8+
célula_T:CD8+_memoria_efectora
célula_T:CD8+_memoria_central
Monocito
Neutrófilo
Eritroblasto
Médula ósea y progenitores

Figura 4

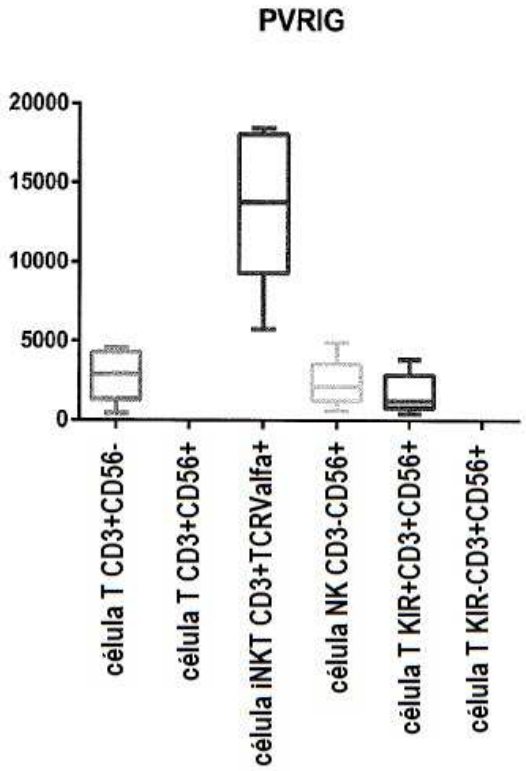

PVRIG
20000
15000
10000
5000
0
célula T CD3+CD56-
célula T CD3+CD56+
célula iNKT CD3+TCRValfa+
célula NK CD3-CD56+
célula T KIR+CD3+CD56+
célula T KIR-CD3+CD56+

Figura 5a:

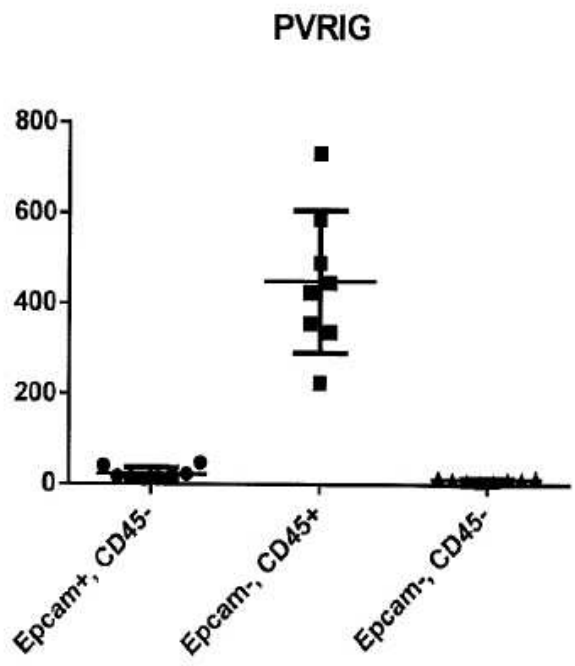


Figura 5b:

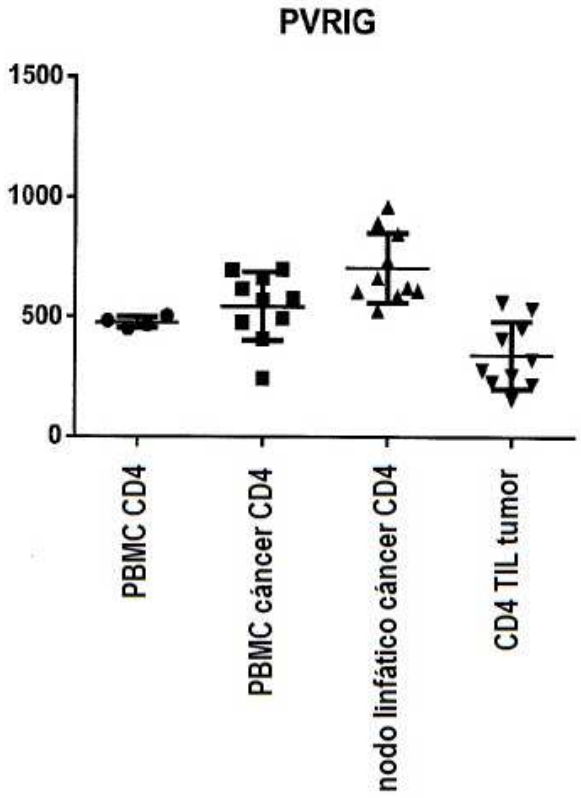

PVRIG
1500
1000
500
0
PBMC CD4
PBMC cáncer CD4
nodo linfático cáncer CD4
CD4 TIL tumor

Figura 5c:

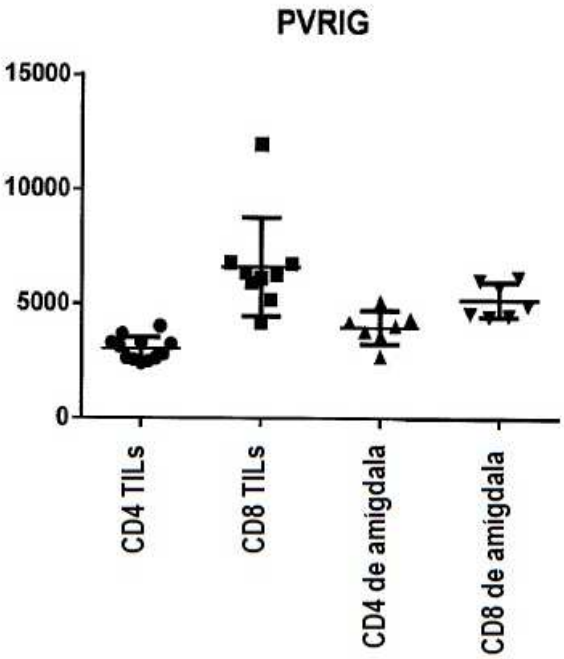

PVRIG
15000
10000
5000
0
CD4 TILs
CD8 TILs
CD4 de amigdala
CD8 de amigdala

Figura 6

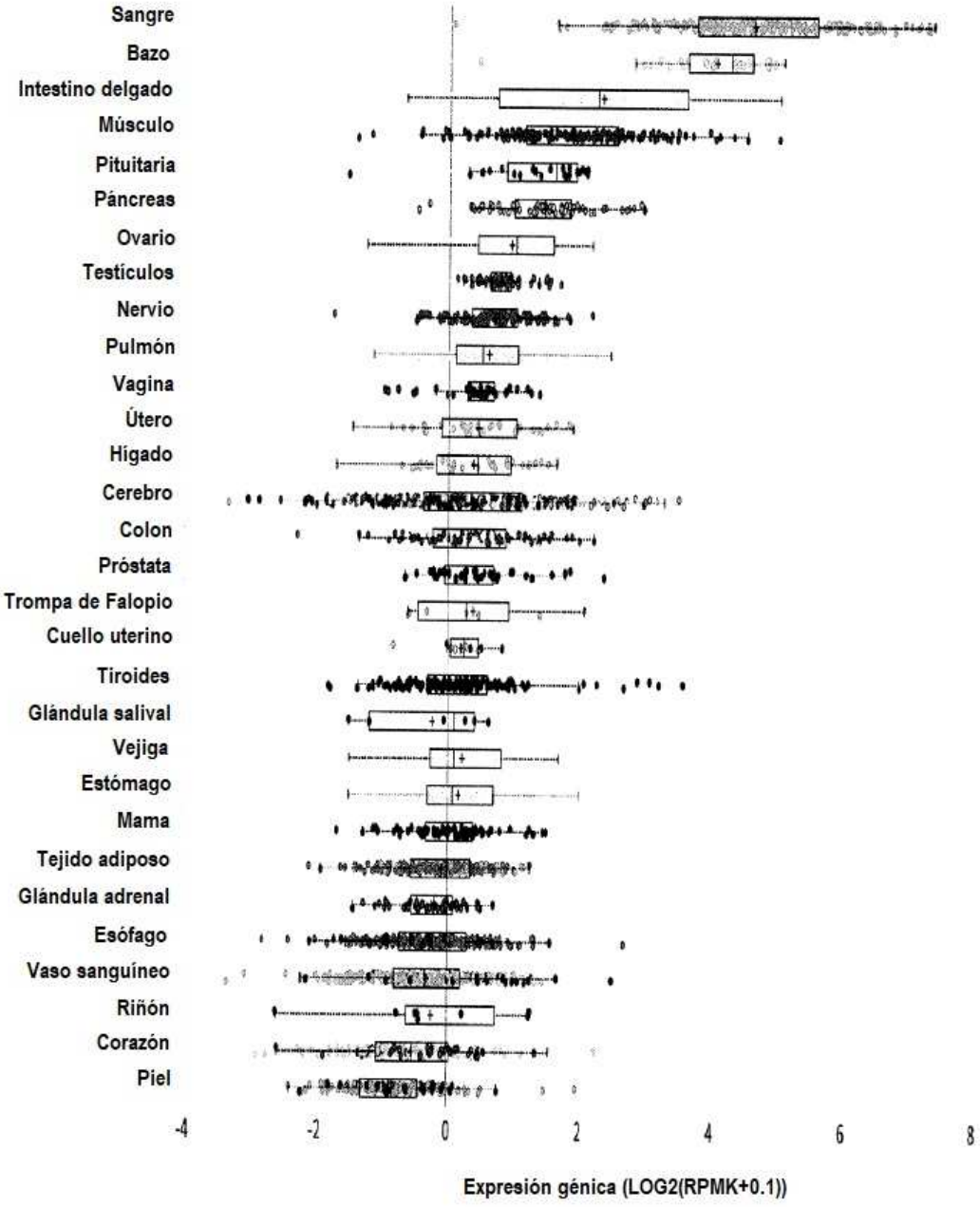

Sangre
Bazo
Intestino delgado
Músculo
Pituitaria
Páncreas
Ovario
Testículos
Nervio
Pulmón
Vagina
Útero
Hígado
Cerebro
Colon
Próstata
Trompa de Falopio
Cuello uterino
Tiroides
Glándula salival
Vejiga
Estómago
Mama
Tejido adiposo
Glándula adrenal
Esófago
Vaso sanguíneo
Riñón
Corazón
Piel
-4
-2
0
2
4
6
8
Expresión génica (LOG2(RPMK+0.1))

Figura 7

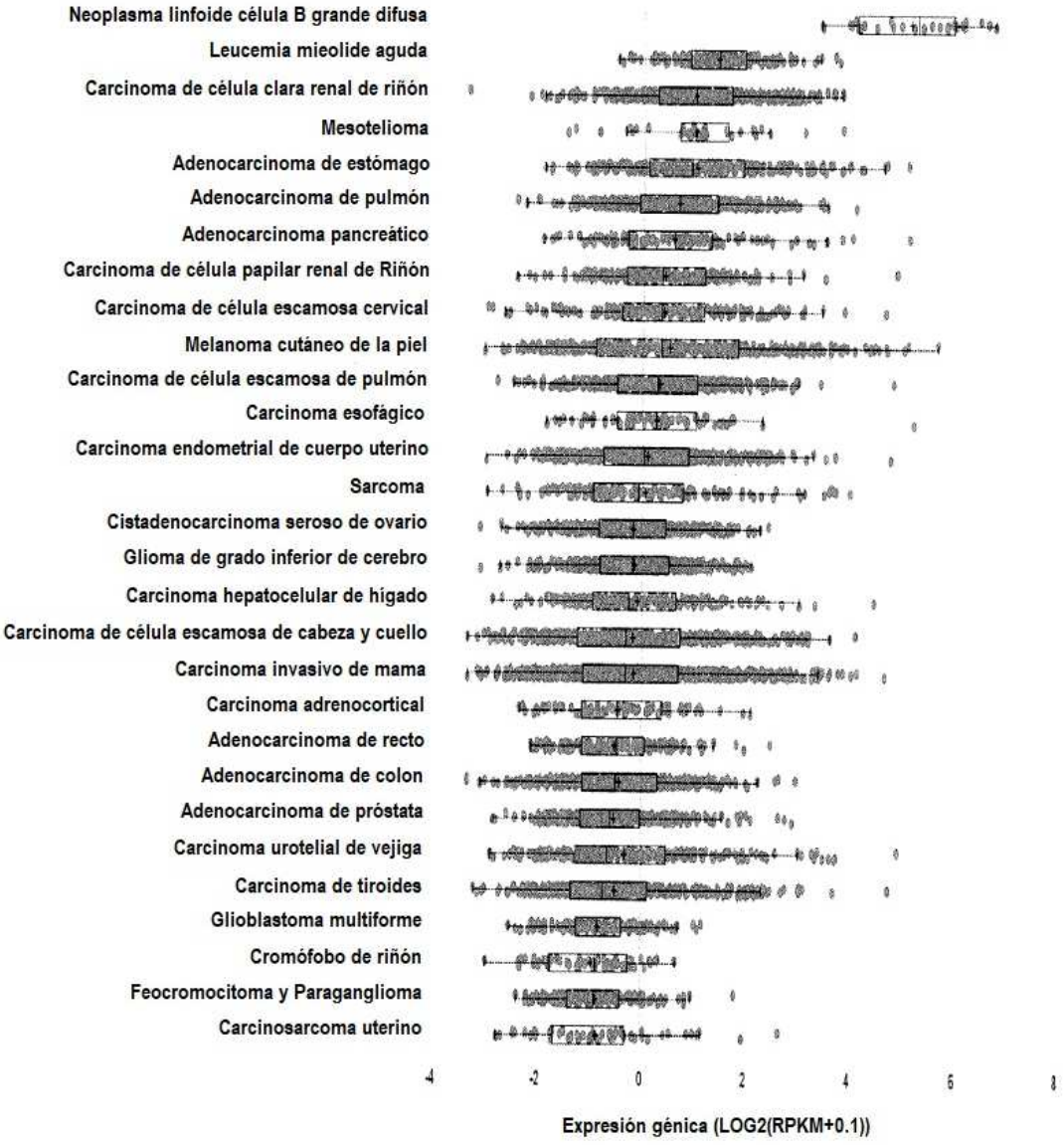

Neoplasma linfoide célula B grande difusa
Leucemia mieolide aguda
Carcinoma de célula clara renal de riñón
Mesotelioma
Adenocarcinoma de estómago
Adenocarcinoma de pulmón
Adenocarcinoma pancreático
Carcinoma de célula papilar renal de Riñón
Carcinoma de célula escamosa cervical
Melanoma cutáneo de la piel
Carcinoma de célula escamosa de pulmón
Carcinoma esofágico
Carcinoma endometrial de cuerpo uterino
Sarcoma
Cistadenocarcinoma seroso de ovario
Glioma de grado inferior de cerebro
Carcinoma hepatocelular de hígado
Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello
Carcinoma invasivo de mama
Carcinoma adrenocortical
Adenocarcinoma de recto
Adenocarcinoma de colon
Adenocarcinoma de próstata
Carcinoma urotelial de vejiga
Carcinoma de tiroides
Glioblastoma multiforme
Cromófobo de riñón
Feocromocitoma y Paraganglioma
Carcinosarcoma uterino
-4
-2
0
2
4
6
8
Expresión génica (LOG2(RPKM+0.1))

Figura 8

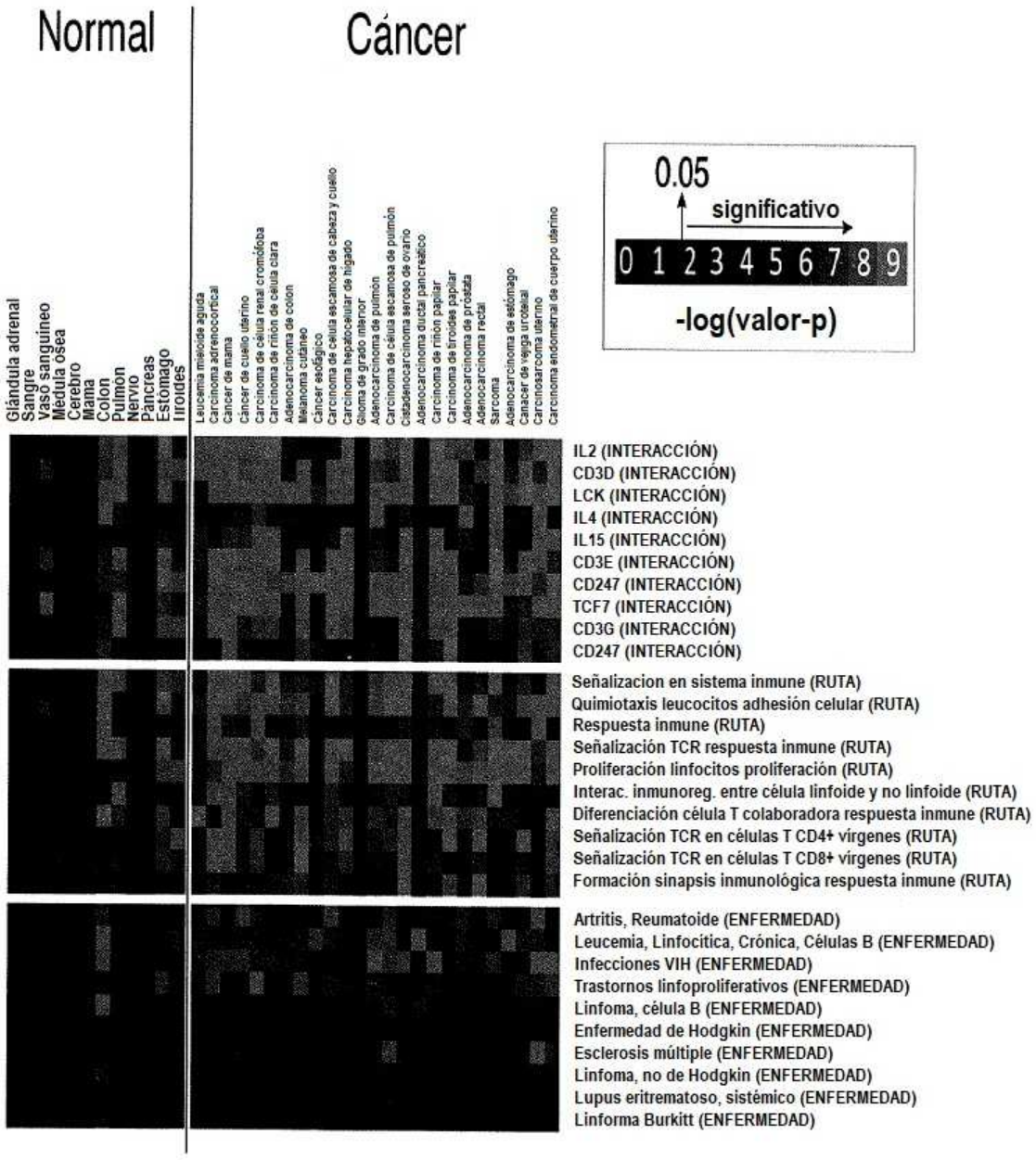

Normal
Cáncer
Glándula adrenal
Sangre
Vaso sanguíneo
Médula ósea
Cerebro
Mama
Colon
Pulmón
Nervio
Pancreas
Estómago
Iroides
Leucemia mieloide aguda
Carcinoma adrenocortical
Cáncer de mama
Cáncer de cuello uterino
Carcinoma de célula renal cromófoba
Carcinoma de riñón de célula clara
Adenocarcinoma de colon
Melanoma cutáneo
Cáncer esofágico
Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello
Carcinoma hepatocelular de hígado
Glioma de grado inferior
Adenocarcinoma de pulmón
Carcinoma de célula escamosa de pulmón
Cistadenocarcinoma seroso de ovario
Adenocarcinoma ductal pancreático
Carcinoma de riñón papilar
Carcinoma de tiroides papilar
Adenocarcinoma de próstata
Adenocarcinoma rectal
Sarcoma
Adenocarcinoma de estómago
Cancer de vejiga urotelial
Carcinosarcoma uterino
Carcinoma endometrial de cuerpo uterino
0.05
significativo
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
-log(valor-p)
IL2 (INTERACCIÓN)
CD3D (INTERACCIÓN)
LCK (INTERACCIÓN)
IL4 (INTERACCIÓN)
IL15 (INTERACCIÓN)
CD3E (INTERACCIÓN)
CD247 (INTERACCIÓN)
TCF7 (INTERACCIÓN)
CD3G (INTERACCIÓN)
CD247 (INTERACCIÓN)
Señalizacion en sistema inmune (RUTA)
Quimiotaxis leucocitos adhesión celular (RUTA)
Respuesta inmune (RUTA)
Señalización TCR respuesta inmune (RUTA)
Proliferación linfocitos proliferación (RUTA)
Interac. inmunoreg. entre célula linfoide y no linfoide (RUTA)
Diferenciación célula T colaboradora respuesta inmune (RUTA)
Señalización TCR en células T CD4+ vírgenes (RUTA)
Señalización TCR en células T CD8+ vírgenes (RUTA)
Formación sinapsis inmunológica respuesta inmune (RUTA)
Artritis, Reumatoide (ENFERMEDAD)
Leucemia, Linfocítica, Crónica, Células B (ENFERMEDAD)
Infecciones VIH (ENFERMEDAD)
Trastornos linfoproliferativos (ENFERMEDAD)
Linfoma, célula B (ENFERMEDAD)
Enfermedad de Hodgkin (ENFERMEDAD)
Esclerosis múltiple (ENFERMEDAD)
Linfoma, no de Hodgkin (ENFERMEDAD)
Lupus eritrematoso, sistémico (ENFERMEDAD)
Linforma Burkitt (ENFERMEDAD)

Figura 9

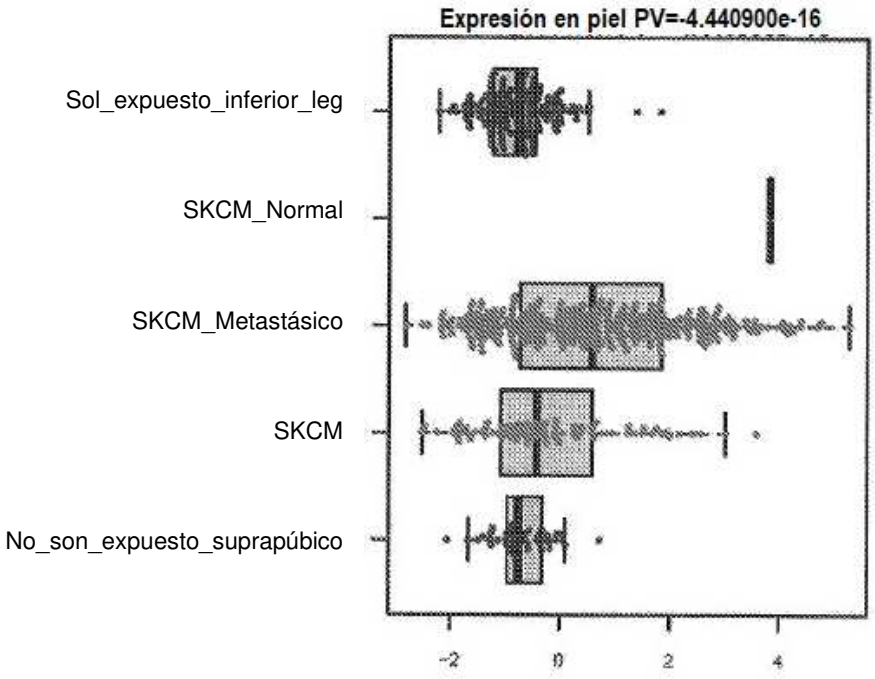


Figura 10

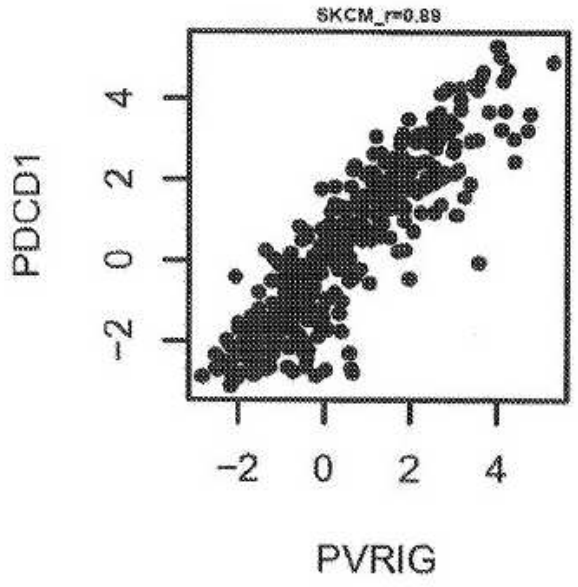


Figura 11

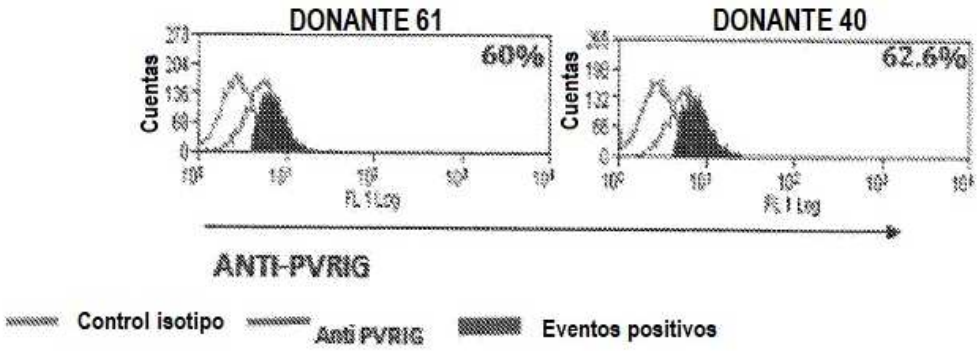

DONANTE 61
60%
Cuentas
DONANTE 40
62.6%
Cuentas
ANTI-PVRIG
Control isotipo
Anti PVRIG
Eventos positivos

Figura 12

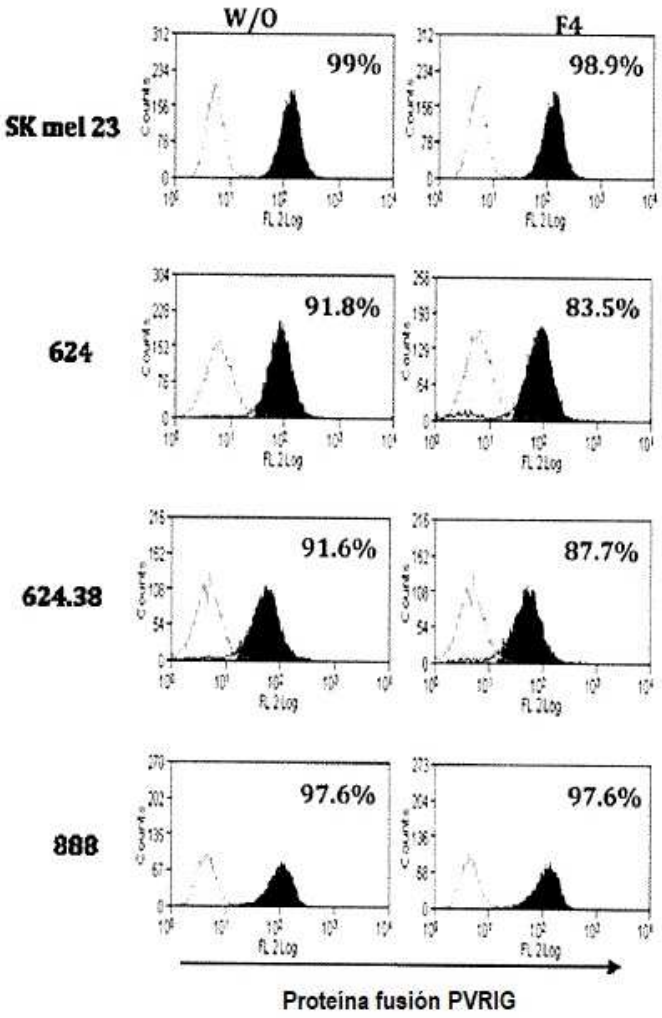

W/O
F4
SK mel 23
99%
98.9%
624
91.8%
83.5%
624.38
91.6%
87.7%
888
97.6%
97.6%
FL 2 Log
Proteína fusión PVRIG

Figura 13

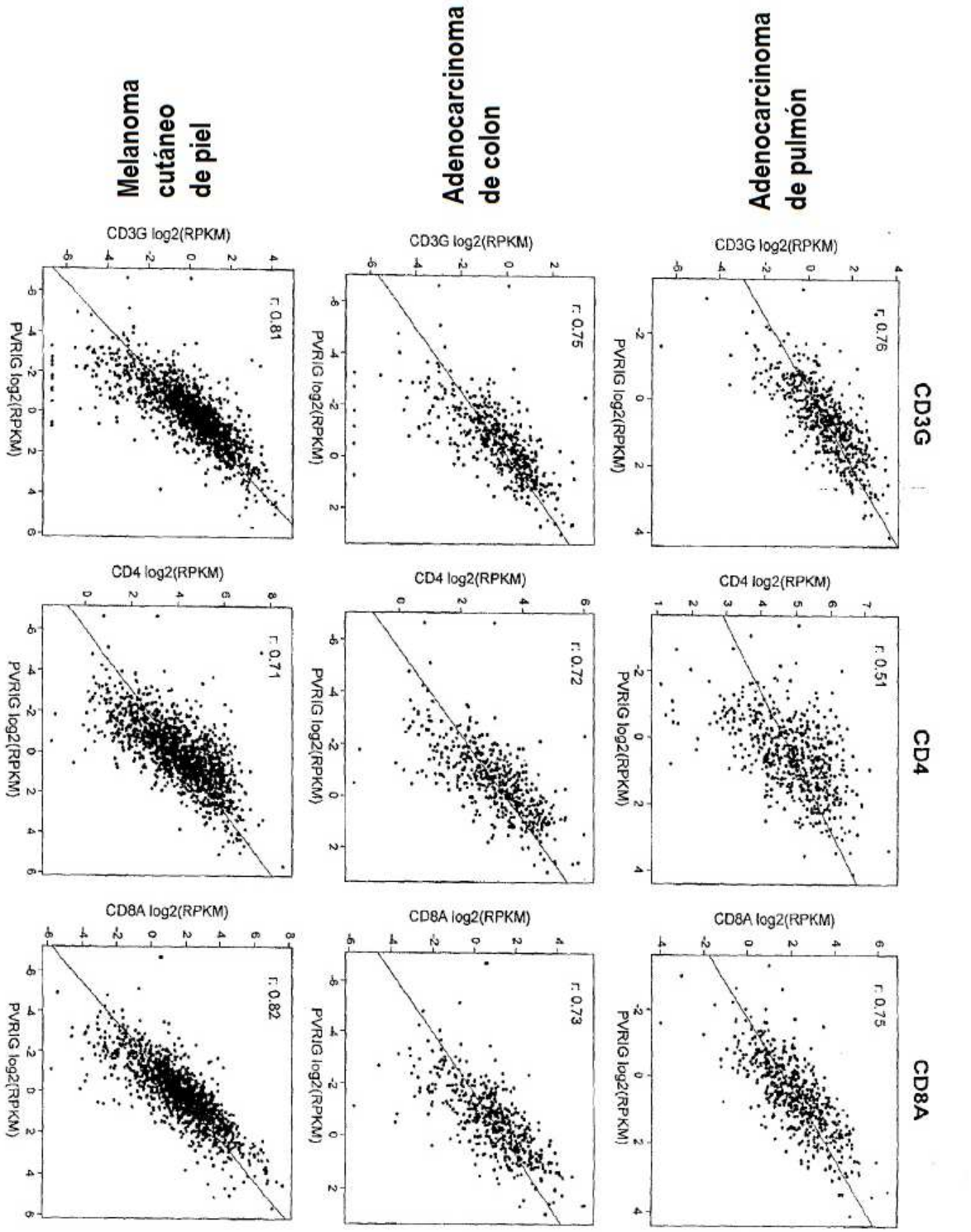
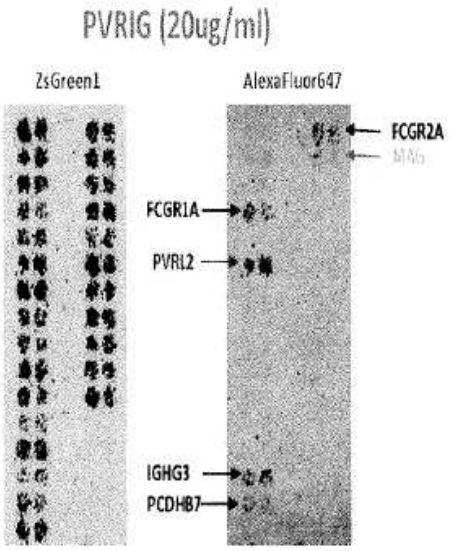

Adenocarcinoma de pulmón
Adenocarcinoma de colon
Melanoma cutáneo de piel
CD3G
CD4
CD8A
CD3G log2(RPKM)
CD4 log2(RPKM)
CD8A log2(RPKM)
PVRIG log2(RPKM)
r: 0.76
r: 0.51
r: 0.75
r: 0.75
r: 0.72
r: 0.73
r: 0.81
r: 0.71
r: 0.82

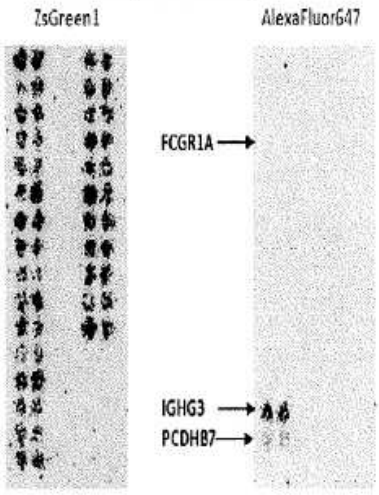
Figura 14:

Patrón manchas

Posición	Id gen	Posición	Id gen
1	ARHGEF2	17	FCGR2A
2	FASLG	18	MAG
3	GPR65	19	KCNJ15
4	FCGR1A	20	C21orf63
5	GNB5	21	MRGPRD
6	PVRL2	22	BAIAP2
7	HBEGF	23	QSOX1
8	PIP5K1C	24	TNFRSF25
9	MRGPRD	25	CD86
10	SHANK2	26	CD86
11	APOM	27	EGFR
12	SLC34A1		
13	STX4		
14	IGHG3		
15	PCDHB7		
16	LY6G6C		



No ligando ensayo



CTLA-4 humana

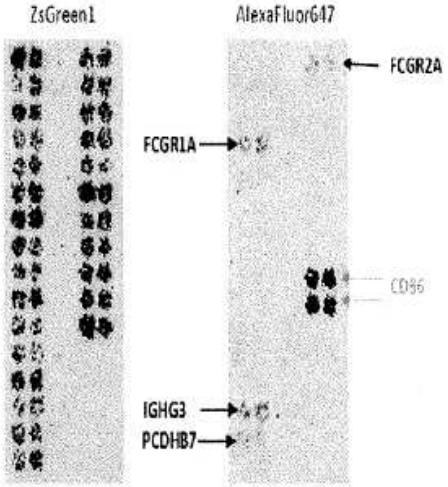


FIG. 15A

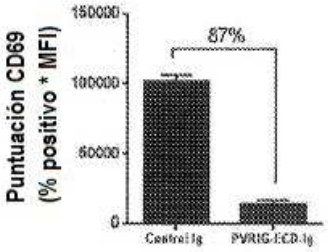


FIG. 15B

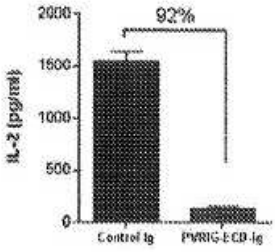


FIG. 15C

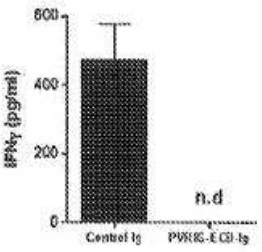


FIG. 15D

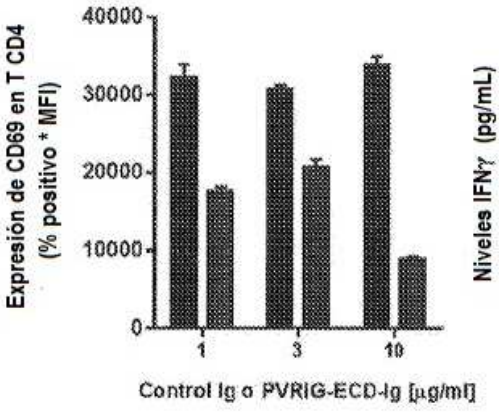


FIG. 15E

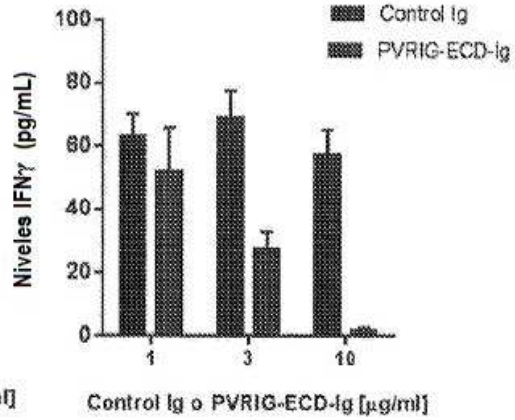


Figura 16

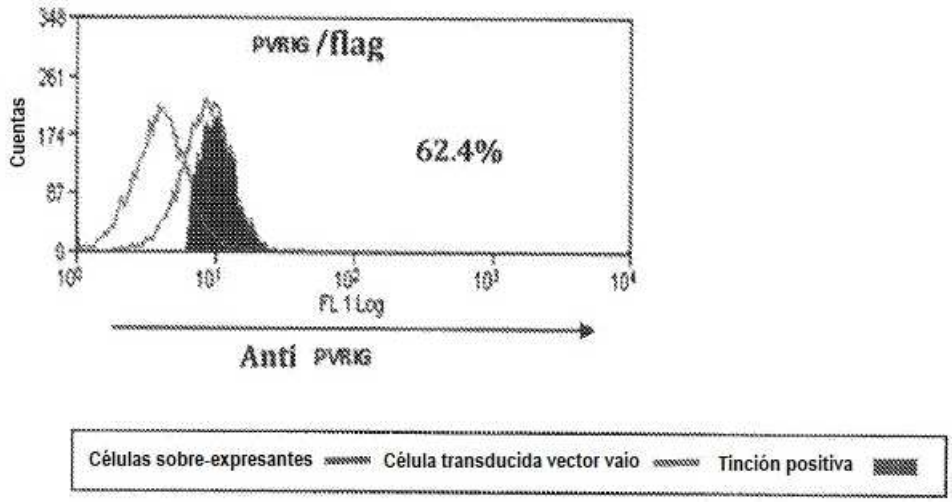


Figura 17

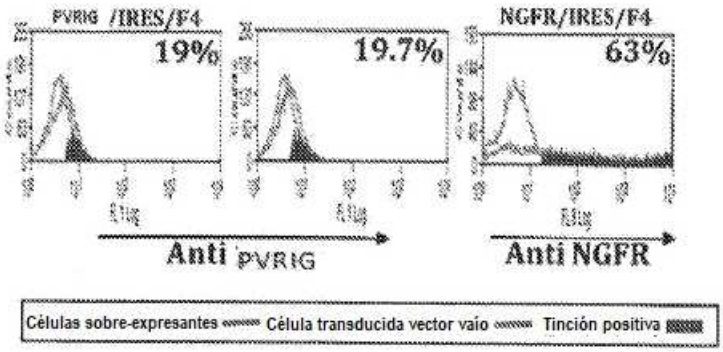


Figura 18A

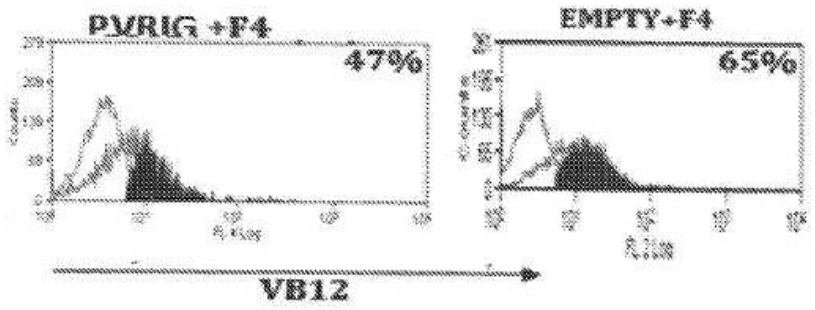


Figura 18B

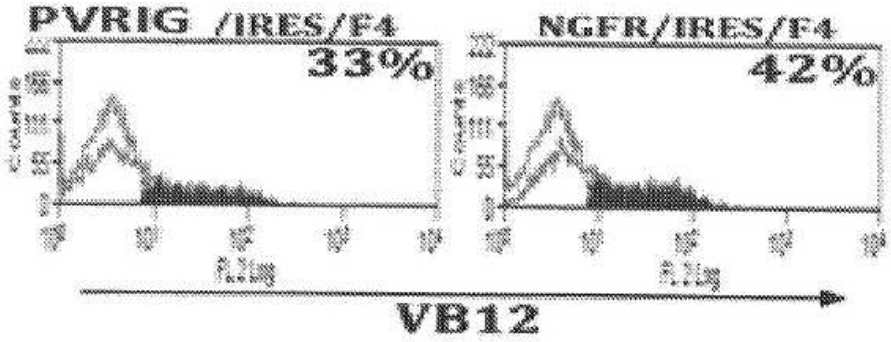


Figura 19

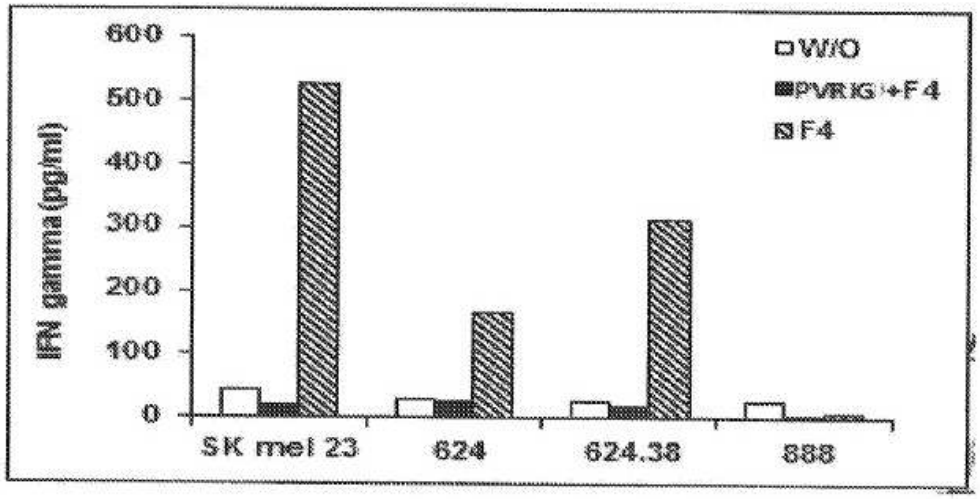


Figura 20A

A

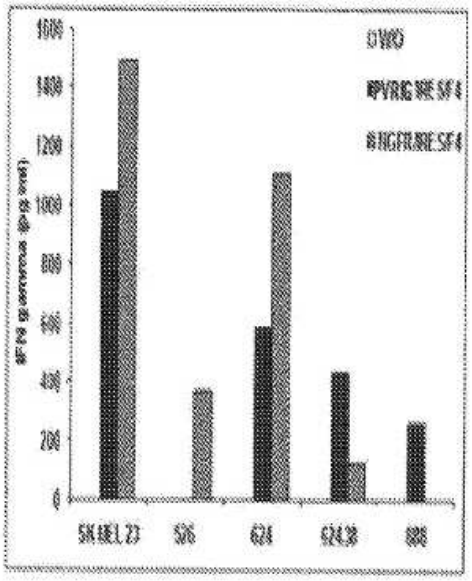


Figura 20B

B

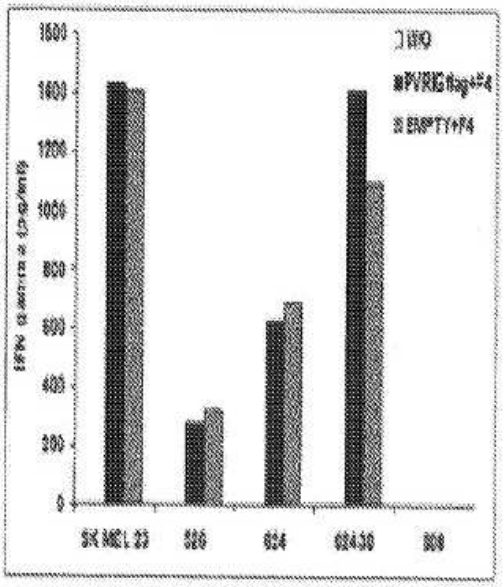


Figura 21

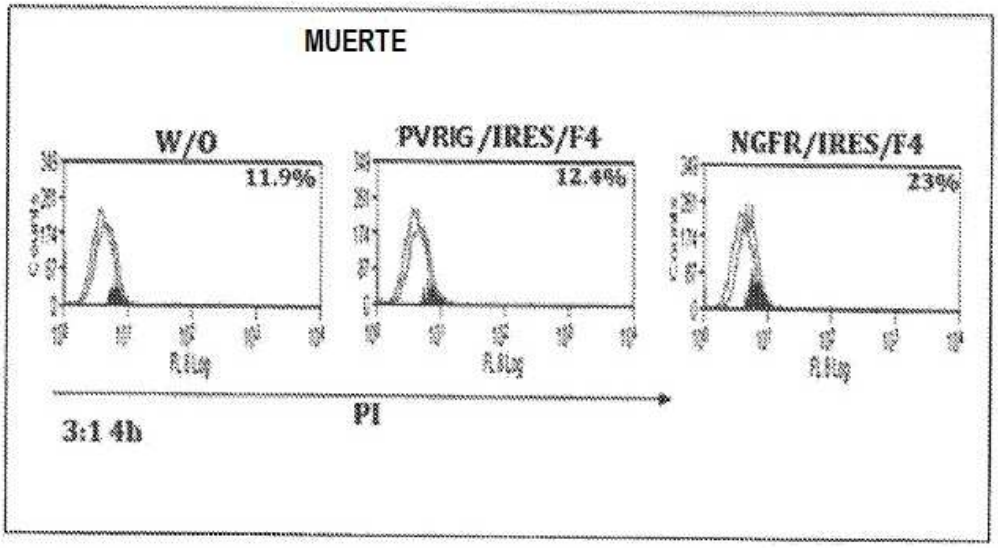


Figura 22

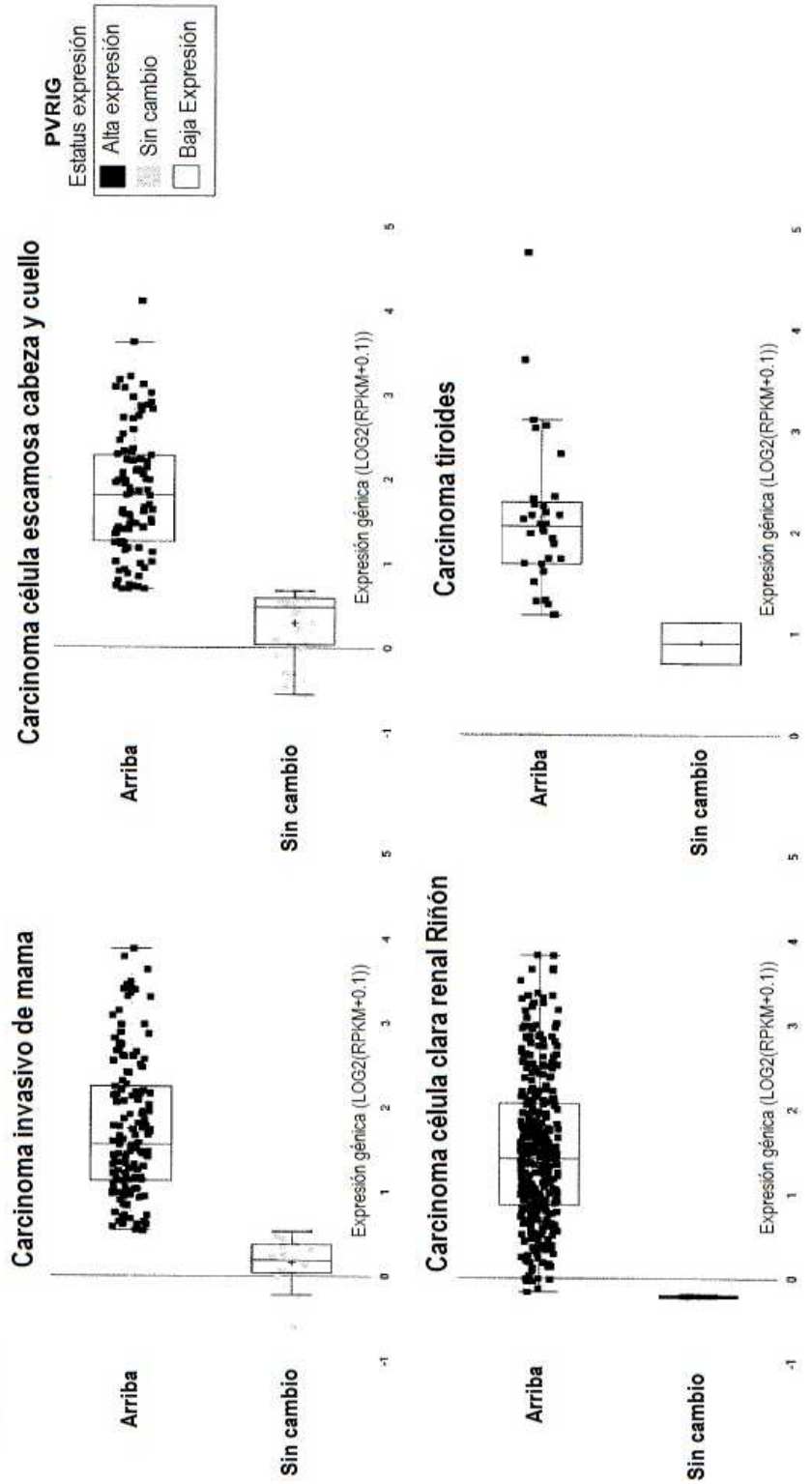

PVRIG
Estatus expresión
Alta expresión
Sin cambio
Baja Expresión
Carcinoma célula escamosa cabeza y cuello
Carcinoma invasivo de mama
Carcinoma célula clara renal Riñón
Carcinoma tiroides
Arriba
Sin cambio
Expresión génica (LOG2(RPKM+0.1))

Figura 23A

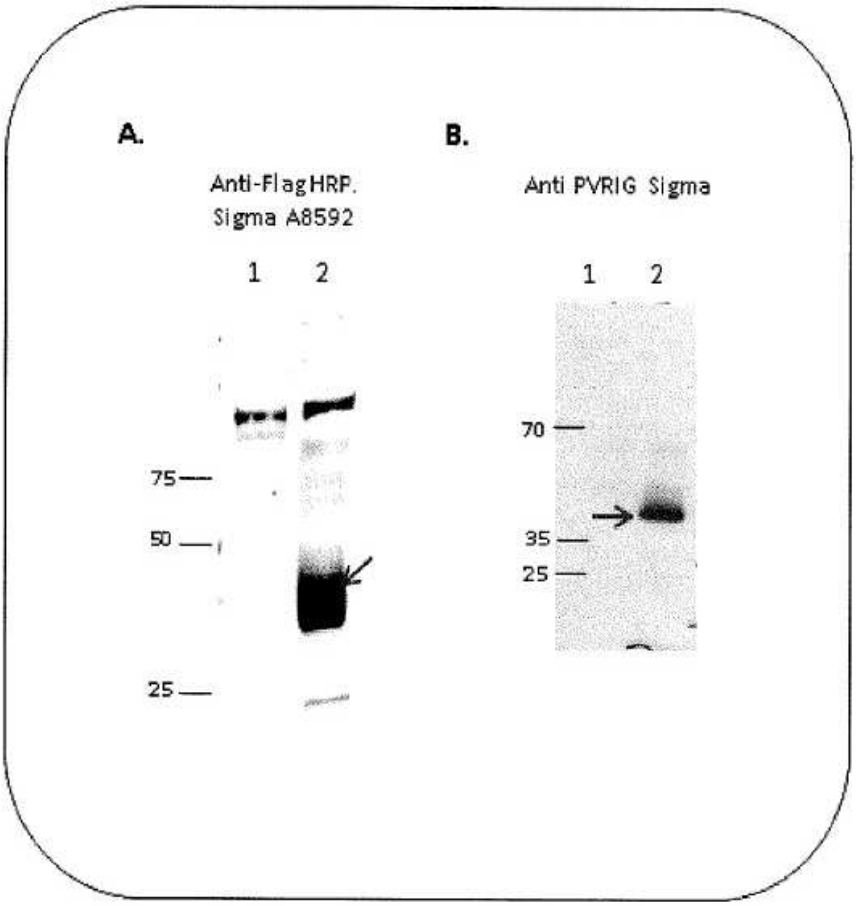


Figura 23B

Figura 24

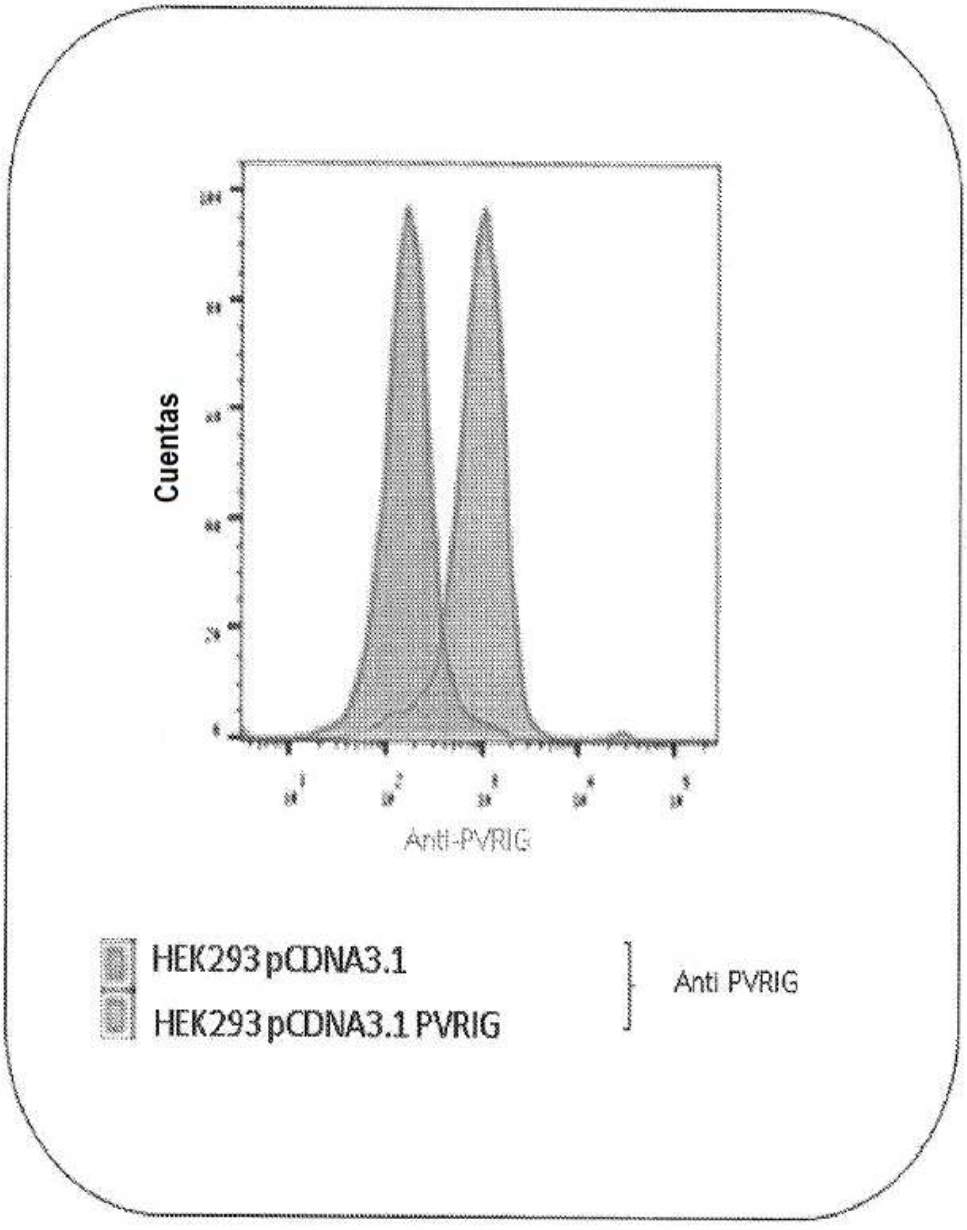

Cuentas
Anti-PVRIG
HEK293 pCDNA3.1
HEK293 pCDNA3.1 PVRIG
Anti PVRIG

Figura 25

PVRIG human WT Longitud completa

Secuencia PVRIG humana inicio en posición 21 - metionina alternativa

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIR
QWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLAGILGV
SGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATINTSCRPATLDTAHPHGGPSW
WASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVR (SEQ ID
NO: 8)

Secuencia PVRIG humana inicio en posición 1 metionina

MRTEAQVPALQPPEPGLEGAMGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWG
GPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPG
LSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATIN
TSCRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPR
GPRAMEGPLGVR (SEQ ID NO: 9)

Señal P alternativa con tres mutaciones C a S en el dominio Fc

CGEN-PVRIGHH-2 Alternativa SP (MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 10)) + CGEN-PVRIG (41-171 de PVRIG_HUMAN) + IgG1 Fc humana mutada en C220S, C226S, C229S de bisagra

MGWSCIILFLVATATGVHSTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQW
APARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADEPKSSDKTHT
SPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

Figura 26

PVLR2 humana isoforma alfa

>gi|5360210|ref|NP_002847.1| nectina-2 precursor isoforma alfa [Homo sapiens]

MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTW
QRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLSVRYPPEVSISGYDDNWYLGRTDAT
LSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIHAVDSLFNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
RASPRDVGPLVWGAVGGTLLVLLLLAGGSLAFILLRVRRRRKSPGGAGGGASGDGGFYDPKAQVLGNGDP
VFWTPVVPGPMEPDGKDEEEEEEEEKAEKGLMLPPPPALEDDMESQLDGSLISRRAVYV (SEQ ID NO: 12)

PVLR2 humana isoforma delta

>gi|112789532|ref|NP_001036189.1| nectina-2 precursor isoforma delta [Homo sapiens]

MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTW
QRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLSVRYPPEVSISGYDDNWYLGRTDAT
LSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIHAVDSLFNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
NTAGAGATGGIIGGIIAAIIATAVAATGILICRQQRKEQTLQGAEEDEDLEGPPSYKPPTPKAKLEAQEM
PSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQEMPRYHELPTLEERSGPLHPGATSLGSPIPVPPGPPAVEDV
SLDLEDEEGEEEEEYLDKINPIYDALSY (SEQ ID NO: 13)

Figura 27

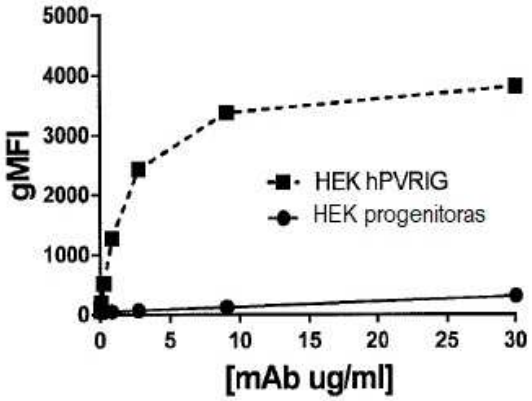


Figura 28

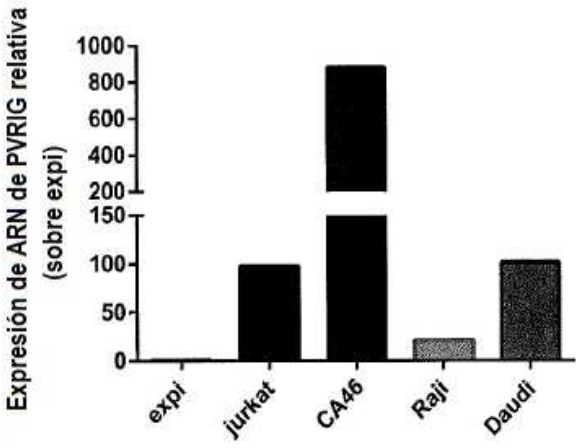


Figura 29

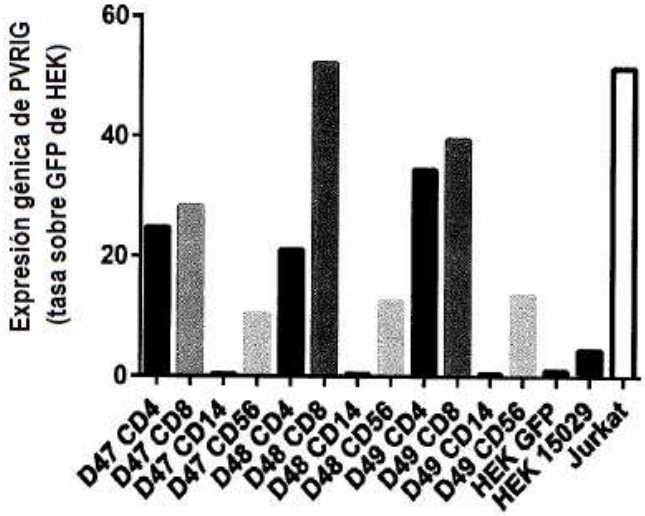

Expresión génica de PVRIG
(tasa sobre GFP de HEK)
60
40
20
0
D47 CD4
D47 CD8
D47 CD14
D47 CD56
D48 CD4
D48 CD8
D48 CD14
D48 CD56
D49 CD4
D49 CD8
D49 CD14
D49 CD56
HEK GFP
HEK 15029
Jurkat

Figura 30A

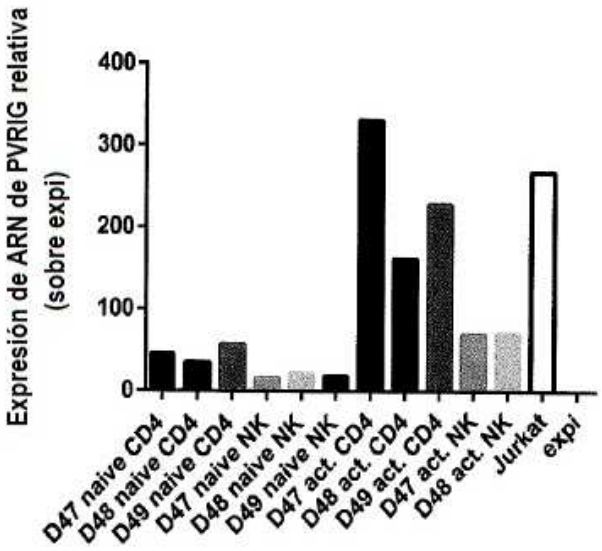


Figura 30B

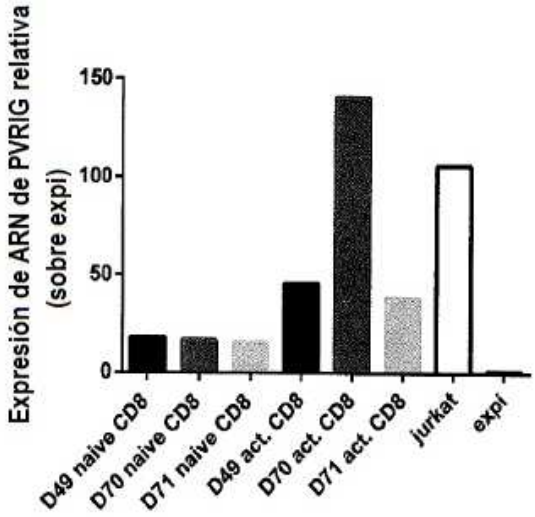


Figura 31A

Anticuerpo (hIgG1)	EC_{50} (HEK OE, nM)	HEK OE/par (5ug/ml, gMFIr)	Jurkat (5ug/ml, gMFIr)	CA46 (5ug/ml, gMFIr)
CPA.7.002	53.47	11.97	1.25	1.16
CPA.7.003	7.12	1.28	3.85	6.71
CPA.7.004	43.74	25.18	1.03	1.16
CPA.7.005	125.50	15.77	0.93	1.02
CPA.7.007	0.99	2.90	4.42	9.82
CPA.7.008	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado
CPA.7.009	67.30	8.35	0.93	0.99
CPA.7.010	30.00	18.76	1.08	1.01
CPA.7.011	128.80	10.86	0.93	0.96
CPA.7.012	0.40	2.01	4.89	8.23
CPA.7.014	19.66	5.90	1.14	0.92
CPA.7.015	1.74	6.64	4.3	7.33
CPA.7.016	28.38	2.20	1.11	1.04
CPA.7.017	2.62	4.56	0.99	1.49
CPA.7.018	20.38	2.06	1.05	0.96
CPA.7.019	2.11	1.94	4.66	9.23
CPA.7.020	108.30	1.37	1.64	1.45
CPA.7.021	12.41	30.59	4.47	7.96
CPA.7.022	7.73	4.60	1.01	1.24
CPA.7.023	10.90	20.31	0.9	1.01
CPA.7.024	22.91	9.92	1.14	1.25
CPA.7.025	No unión	No unión	No evaluado	No evaluado
CPA.7.026	8.169	1.16	1.00	0.99
CPA.7.027	No unión	No unión	No evaluado	No evaluado
CPA.7.028	21.5	2.34	9.57	3.16
CPA.7.029	3.87	1.24	1.17	0.85
CPA.7.031	No unión	No unión	No evaluado	No evaluado
CPA.7.032	49.62	4.50	1.81	1.64
CPA.7.033	221	1.8221999	1.94	1.17
CPA.7.034	55.69	4.12	1.25	1.01
CPA.7.035	No unión	No unión	No evaluado	No evaluado
CPA.7.036	14.19	5.68	1.69	1.46
CPA.7.037	Ajuste no fiable	4.56	1.78	1.28

Figura 31B

Anticuerpo (hIgG1)	EC_{50} (HEK OE, nM)	HEK OE/par (5ug/ml, gMFIr)	Jurkat (5ug/ml, gMFIr)	CA46 (5ug/ml, gMFIr)
CPA.7.038	2436	4.36	No evaluado	No evaluado
CPA.7.039	2.99	6.52	1.55	1.40
CPA.7.040	0.84	7.91	1.78	1.59
CPA.7.041	14.35	3.25	No evaluado	No evaluado
CPA.7.042	5.42	4.20	1.57	1.28
CPA.7.043	7.63	5.47	1.20	1.08
CPA.7.044	43.64	3.24	1.03	0.97
CPA.7.045	5.17	4.04	1.68	1.05
CPA.7.046	Ajuste no fiable	No evaluado	No evaluado	No evaluado
CPA.7.047	4.61	5.89	0.81	0.92
CPA.7.049	1.94	2.56	No evaluado	No evaluado
CPA.7.050	121.5	4.29	2.72	2.02

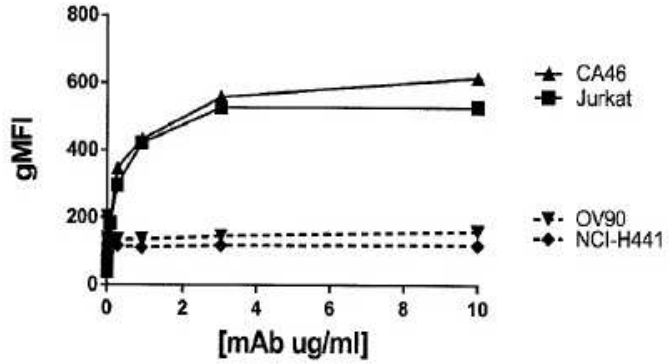
Figura 32A

Anticuerpo (hIgG1)	NK int. CD56 humanas (gMFIr, 5ug/ml)	Células T CD8+ humanas (gMFIr, 5ug/ml)	OE/par cyno Expi (gMFIr, 5ug/ml)	Células cyno NK (gMFIr, 5ug/ml)	Células T CD3+ cyno (gMFIr, 5ug/ml)
CPA.7.002	3.21	1.01	1.16	2.24	1.01
CPA.7.003	16.21	1.41	1.36	No evaluado	No evaluado
CPA.7.004	1.30	0.98	1.1	No evaluado	No evaluado
CPA.7.005	2.35	1.07	1.21	1.12	0.99
CPA.7.007	5.31	1.32	1.11	No evaluado	No evaluado
CPA.7.008	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado
CPA.7.009	1.34	0.98	1.08	No evaluado	No evaluado
CPA.7.010	2.09	1.06	1.41	No evaluado	No evaluado
CPA.7.011	1.19	1.02	1.06	No evaluado	No evaluado
CPA.7.012	1.62	1.18	1.98	No evaluado	No evaluado
CPA.7.014	1.57	0.98	1.06	No evaluado	No evaluado
CPA.7.015	2.82	1.14	1.11	No evaluado	No evaluado
CPA.7.016	2.39	1.05	1.43	No evaluado	No evaluado
CPA.7.017	1.73	0.86	1.30	No evaluado	No evaluado
CPA.7.018	1.62	1.04	1.06	No evaluado	No evaluado
CPA.7.019	4.23	1.36	1.23	No evaluado	No evaluado
CPA.7.020	3.12	1.07	3.10	No evaluado	No evaluado
CPA.7.021	3.74	1.23	1.08	1.91	1.01
CPA.7.022	1.27	0.87	No evaluado	No evaluado	No evaluado
CPA.7.023	1.11	0.99	1.08	No evaluado	No evaluado
CPA.7.024	1.20	1.02	5.67	0.30	1.06
CPA.7.025	No evaluado	No evaluado	1.41	No evaluado	No evaluado
CPA.7.026	1.72	0.92	1.31	No evaluado	No evaluado
CPA.7.027	No evaluado	No evaluado	1.45	No evaluado	No evaluado
CPA.7.028	21.42	1.40	1.34	No evaluado	No evaluado
CPA.7.029	1.24	0.90	1.29	No evaluado	No evaluado
CPA.7.031	No evaluado	No evaluado	1.47	No evaluado	No evaluado
CPA.7.032	10.43	0.93	1.46	No evaluado	No evaluado
CPA.7.033	2.46	0.93	1.39	No evaluado	No evaluado
CPA.7.034	1.05	0.89	1.33	No evaluado	No evaluado
CPA.7.035	No evaluado	No evaluado	1.24	No evaluado	No evaluado
CPA.7.036	4.17	0.87	1.24	No evaluado	No evaluado
CPA.7.037	1.64	1.01	1.40	No evaluado	No evaluado
CPA.7.038	18.08	1.03	7.88	3.35	1.01
CPA.7.039	1.43	0.92	7.53	0.31	1.01

Figura 32B

Anticuerpo (hIgG1)	NK int. CD56 humanas (gMFIr, 5ug/ml)	Células T CD8+ humanas (gMFIr, 5ug/ml)	OE/par cyno Expi (gMFIr, 5ug/ml)	Células cyno NK (gMFIr, 5ug/ml)	Células T CD3+ cyno (gMFIr, 5ug/ml)
CPA.7.040	1.73	0.88	1.32	No evaluado	No evaluado
CPA.7.041	6.15	1.01	3.31	1.26	0.98
CPA.7.042	6.10	0.92	3.71	1.38	0.99
CPA.7.043	1.10	0.83	1.50	No evaluado	No evaluado
CPA.7.044	8.79	0.88	1.31	No evaluado	No evaluado
CPA.7.045	1.28	0.84	1.43	No evaluado	No evaluado
CPA.7.046	No evaluado	No evaluado	4.42	No evaluado	No evaluado
CPA.7.047	0.99	0.90	1.29	No evaluado	No evaluado
CPA.7.049	No evaluado	No evaluado	1.37	No evaluado	No evaluado
CPA.7.050	4.98	1.23	1.47	0.64	1.03

Figura 33


800
600
400
200
0
gMFI
0
2
4
6
8
10
[mAb ug/ml]
CA46
Jurkat
OV90
NCI-H441

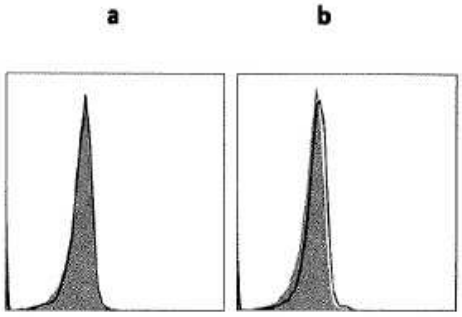


Figura 34A Figura 34B

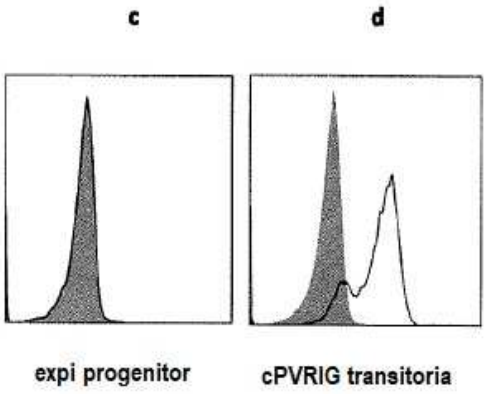


Figura 34C Figura 34D

Figura 35

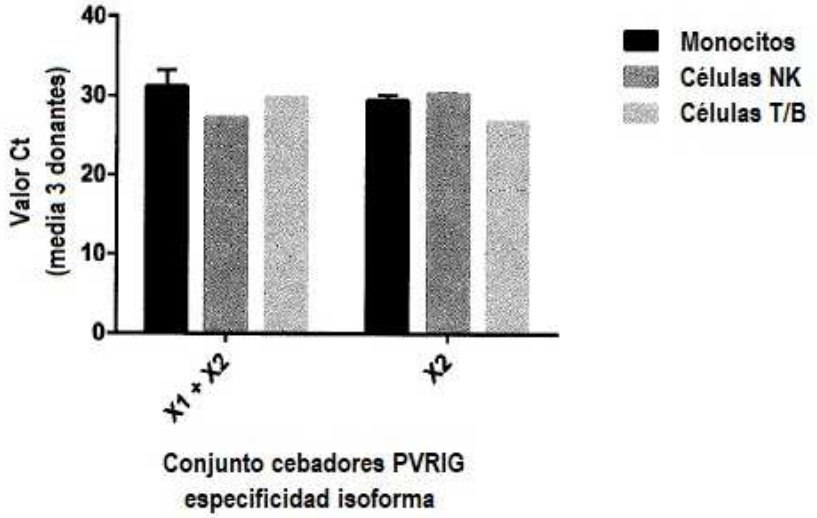

40
30
20
10
0
Valor Ct
(media 3 donantes)
X1 + X2
X2
Conjunto cebadores PVRIG
especificidad isoforma
Monocitos
Células NK
Células T/B

Figura 36A

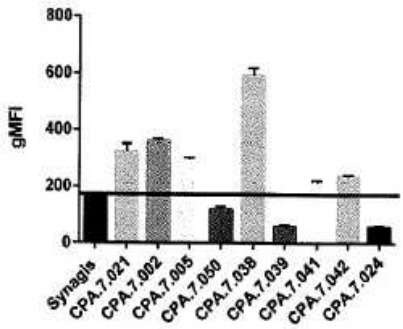


Figura 36B

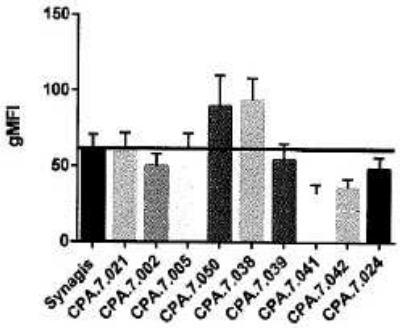


Figura 36C

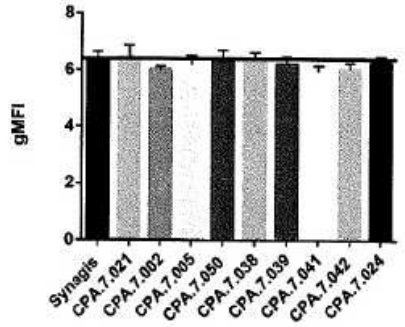


Figura 37A

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.001	GGTFSSYA	14	IIPIFGTA	15	AREEVSSPYGMDV	16	TGAVTSGHY	17	DTG	18	LLSYSGASWV	19
CPA.7.003	GFSLSHFS	20	FDPEEGGT	21	ATGIWYSSGWPVDY	22	QSLLDSSGYNY	23	LGS	24	MQALQTPIT	25
CPA.7.004	GYTLTELS	26	FDPEDGET	27	ATVSRVRGVINYYYYMDV	28	QSLLYRNGNNY	29	LGS	30	MQALQTPPT	31
CPA.7.006	GGTFGTYA	32	ITPISATI	33	ARGFEYSDGLLDD	34	QSLFYSDDGNTY	35	RLS	36	MQHMEFPLT	37
CPA.7.008	SGSISSTNW	38	IYHSGST	39	ARVGPAAIYY	40	SNNVGYEG	41	RNN	42	SAWDSSLNAVV	43
CPA.7.009	GYTLTELS	44	FDPEDGET	45	ATAKPGIAVAGQNYYYYYMDV	46	QSLLYRNGNNY	47	LGS	48	MQALQTPPT	49
CPA.7.010	GFTFSSYA	50	ISYDGSNK	51	ASSPIGYSYGYWGGMDV	52	SGIDVRTNK	53	FQSDSDK	54	LIWHTSGWV	55
CPA.7.011	GYTLTELS	56	FDPEDGET	57	ATGPAAAGVGYYYYMDV	58	QSLLYRNGYNY	59	LGS	60	MQALQTPPT	61
CPA.7.012	GFTFSSYA	62	ISYDGSNK	63	ARDVMVYCSSTSCYFYGMDV	64	QDIRDY	65	DAS	66	QQFENLPIT	67
CPA.7.013	GYTLTELS	68	FDPEDGET	69	ATGGYSSGFNYYYYYMDV	70	QSLLYRNGNNY	71	LGS	72	MQALQTPPT	73
CPA.7.014	GYTLTELS	74	FDPEDGET	75	ATGVTTYYYYGMDV	76	QSLLYSNGNNF	77	LGS	78	MQALQTPPT	79
CPA.7.015	GFTFSSYG	80	IRYDGSNK	81	ARDLFDFWWDGMDV	82	QSVSSMY	83	GAS	84	QQYVSSPMYT	85
CPA.7.017	GGTFNNYG	86	IIPLFGTT	87	ARDRMAADGMAVFDY	88	SSNIGRHF	89	KND	90	SSWDAALNGVV	91
CPA.7.018	GYTLTELS	92	FDPEDGET	93	ATEVPMVRGARRYYYYMDV	94	QTLLYINENNY	95	LGS	96	MQGLQTPPT	97

ES 2 806 800 T3

Figura 37B

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.019	GGSISNSNYY	98	IYYSGST	99	ARGAWELSLGDWFDP	100	SSNIGAGYD	101	GNN	102	QSYDSSLSVYVV	103
CPA.7.021	GFTFGTSS	104	ISFDGTEI	105	AKGSGNIYFYSGMDV	106	QSISGW	107	ETS	108	QQYYSYPLT	109
CPA.7.022	GYTLTELS	110	FDPEDGET	111	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	112	QSLLYSNGYNY	113	LGS	114	MQALQSPVT	115
CPA.7.023	GYTLTELS	116	FDPEDGET	117	ATDSRDGPAARGGYYYYMDV	118	QSLLYINGYNY	119	LGS	120	MQALQTPPT	121
CPA.7.024	GGTFSSYA	122	IIPIFGTA	123	ARDAYYYDSSGYYNPDAFDI	124	QSLLHSNGYNY	125	LGS	126	MQGLQTPRT	127
CPA.7.033	GGTFSSSA	128	IIPIYGIT	129	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	130	QDIDDD	131	EAS	132	LQHDNLPLT	133
CPA.7.034	GYTLTELS	134	FDPEDGET	135	ATEDPGPVAGPYYYYGMDV	136	QSLLYINGYHY	137	LGS	138	MQALQTPPT	139
CPA.7.036	GGTFSSSA	140	IIPIYGIT	141	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	142	QSLLDSDDGNTY	143	TLS	144	MQRLQFPLT	145
CPA.7.040	GYTLTELS	146	FDPEDGET	147	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	148	QSLLYRNGYNY	149	WGS	150	MQAVQNPPT	151
CPA.7.046	GGTFSSSA	152	IIPIYGIT	153	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	154	QTMNNY	155	DAS	156	QQYGDWLPIT	157
CPA.7.047	GYTLTELS	158	FDPEDGET	159	ATAFPEATISYYYYMDV	160	QSLLYRNGYNY	161	WGS	162	MQAVQNPPT	163
CPA.7.049	GGTFSSSA	164	IIPIYGIT	165	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	166	RSLLDSDDGNTH	167	SLS	168	MQRKEFPLT	169
CPA.7.050	GGTFSSYA	170	IIPIFGTA	171	ARGPWYYDSSGYSSYAYYMDV	172	QSLLHSDGYNY	173	LGS	174	MQALHTPGVT	175

ES 2 806 800 T3

Figura 38A

CPA.7.001

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREEVSSPYGMDVWGQGTTVTVSS	176
vhCDR1	GGTFSSYA	177
vhCDR2	IIPIFGTA	178
vhCDR3	AREEVSSPYGMDV	179
HC longitud completa	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREEVSSPYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	180
Dominio variable ligero (v)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGTSTGAVTSGHYPYWFQQKPGQAPKTLIYDTGNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEADYYCLLSYSGASWVFGGGTKLTVLG	181
vlCDR1	TGAVTSGHY	182
vlCDR2	DTG	183
vlCDR3	LLSYSGASWV	184
Cadena ligera longitud completa	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGTSTGAVTSGHYPYWFQQKPGQAPKTLIYDTGNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEADYYCLLSYSGASWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	185

Figura 38B
CPA.7.003

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFSLSHFSMHWVRQVPGKGLEWLGGFDPEEGGTIPAQKFQGRLTMTEDTST ETAYMELSSLRSEDTAVYYCATGIWYSSGWPVDYWGPGTLVTVSS	186
vhCDR1	GFSLSHFS	187
vhCDR2	FDPEEGGT	188
vhCDR3	ATGIWYSSGWPVDY	189
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGPWYYDSSGYSSYAYYMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	190
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGGPASISCRSSQSLLDSSGYNYVDWYLQKPGQSPQLLISLGSDRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCMQALQTPITFGQGTRLEIKR	191
vlCDR1	QSLLDSSGYNY	192
vlCDR2	LGS	193
vlCDR3	MQALQTPIT	194
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGGPASISCRSSQSLLDSSGYNYVDWYLQKPGQSPQLLISLGSDRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCMQALQTPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	195

ES 2 806 800 T3

Figura 38C
CPA.7.004

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATVSRVRGVINYYYYMDV WGKGTTVTVSS	196
vhCDR1	GYTLTELS	197
vhCDR2	FDPEDGET	198
vhCDR3	ATVSRVRGVINYYYYMDV	199
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATVSRVRGVINYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	200
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKLEIKR	201
vlCDR1	QSLLYRNGNNY	202
vlCDR2	LGS	203
vlCDR3	MQALQTPPT	204
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	205

ES 2 806 800 T3

Figura 38D
CPA.7.006

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRVSCKPSGGTFGTYAFTWVRQAPGQGLEWMGGITPISATINRAQNLQDRLTITADESTT TVHMDLTSLRSEDTAVYYCARGFEYSDGLLDDWGQGTLVTVSS	206
vhCDR1	GGTFGTYA	207
vhCDR2	ITPISATI	208
vhCDR3	ARGFEYSDGLLDD	209
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRVSCKPSGGTFGTYAFTWVRQAPGQGLEWMGGITPISATINRAQNLQDRLTITADESTT TVHMDLTSLRSEDTAVYYCARGFEYSDGLLDDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	210
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQTPLSLPVIPGEPASISCRSSQSLFYSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYRLSHRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQHMEFPLTFGGGTKVEIKR	211
vlCDR1	QSLFYSDDGNTY	212
vlCDR2	RLS	213
vlCDR3	MQHMEFPLT	214
Cadena ligera long. completa	DIVMTQTPLSLPVIPGEPASISCRSSQSLFYSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYRLSHRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQHMEFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	215

ES 2 806 800 T3

Figura 38E
CPA.7.008

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCVVSSGSISSTNWWTWVRQPPGKGLEWIGEIYHSGSTSYNSSLKSRVTISEDKSKNQIS LRLSSVTAADTAVYYCARVGPAAIYYWGQGTLVTVSS	216
vhCDR1	SGSISSTNW	217
vhCDR2	IYHSGST	218
vhCDR3	ARVGPAAIYY	219
HC longitud completa	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCVVSSGSISSTNWWTWVRQPPGKGLEWIGEIYHSGSTSYNSSLKSRVTISEDKSKNQIS LRLSSVTAADTAVYYCARVGPAAIYYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	220
Dominio variable ligero (vl)	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGYEGAAWLQQHQGHAPKLLLYRNNNRPSGISKRFSASRSGNTASLTITG LQPEDEADYYCSAWDSSLNAVVFGGGTQLTVLG	221
vlCDR1	SNNVGYEG	222
vlCDR2	RNN	223
vlCDR3	SAWDSSLNAVV	224
Cadena ligera long. completa	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGYEGAAWLQQHQGHAPKLLLYRNNNRPSGISKRFSASRSGNTASLTITG LQPEDEADYYCSAWDSSLNAVVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	225

ES 2 806 800 T3

Figura 38F
CPA.7.009

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATAKPGIAVAGQNYYYYYMDVWGKGTTVTVSS	226
vhCDR1	GYTLTELS	227
vhCDR2	FDPEDGET	228
vhCDR3	ATAKPGIAVAGQNYYYYYMDV	229
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATAKPGIAVAGQNYYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	230
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKLEIKR	231
vlCDR1	QSLLYRNGNNY	232
vlCDR2	LGS	233
vlCDR3	MQALQTPPT	234
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	235

ES 2 806 800 T3

Figura 38G
CPA.7.010

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSPIGYSYGYWGGMDVWGQGTTVTVSS	236
vhCDR1	GFTFSSYA	237
vhCDR2	ISYDGSNK	238
vhCDR3	ASSPIGYSYGYWGGMDV	239
HC longitud completa	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSPIGYSYGYWGGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	240
Dominio variable ligero (vl)	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGIDVRTNKIFWYQVKPGSPPQHLLTFQSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANA GILIISGLQSEDEADYYCLIWHTSGWVFGGGTQLTVLG	241
vlCDR1	SGIDVRTNK	242
vlCDR2	FQSDSDK	243
vlCDR3	LIWHTSGWV	244
Cadena ligera long. completa	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGIDVRTNKIFWYQVKPGSPPQHLLTFQSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANA GILIISGLQSEDEADYYCLIWHTSGWVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	245

Figura 38H
CPA.7.011

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGPAAAGVGYYYYMDV WGKGTTVTVSS	246
vhCDR1	GYTLTELS	247
vhCDR2	FDPEDGET	248
vhCDR3	ATGPAAAGVGYYYYMDV	249
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGPAAAGVGYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	250
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKR	251
vlCDR1	QSLLYRNGYNY	252
vlCDR2	LGS	253
vlCDR3	MQALQTPPT	254
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	255

ES 2 806 800 T3

Figura 38I
CPA7.012

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVMVYCSSTSCYFYGMDVWGQGTTVTVSS	256
vhCDR1	GFTFSSYA	257
vhCDR2	ISYDGSNK	258
vhCDR3	ARDVMVYCSSTSCYFYGMDV	259
HC longitud completa	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVMVYCSSTSCYFYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	260
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCQASQDIRDYLNWYQKKPGKAPKLLIYDASNLEAGVPSRFSGSGSGTDFTFTISGLQ PEDVATYYCQQFENLPITFGQGTRLEIKR	261
vlCDR1	QDIRDY	262
vlCDR2	DAS	263
vlCDR3	QQFENLPIT	264
Cadena ligera long. completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCQASQDIRDYLNWYQKKPGKAPKLLIYDASNLEAGVPSRFSGSGSGTDFTFTISGLQ PEDVATYYCQQFENLPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	265

ES 2 806 800 T3

Figura 38J
CPA.7.013

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYSSGFNYYYYYMDV WGKGTTVTVSS	266
vhCDR1	GYTLTELS	267
vhCDR2	FDPEDGET	268
vhCDR3	ATGGYSSGFNYYYYYMDV	269
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYSSGFNYYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	270
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKLEIKR	271
vlCDR1	QSLLYRNGNNY	272
vlCDR2	LGS	273
vlCDR3	MQALQTPPT	274
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	275

ES 2 806 800 T3

Figura 38K
CPA.7.014

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGVTTYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	276
vhCDR1	GYTLTELS	277
vhCDR2	FDPEDGET	278
vhCDR3	ATGVTTYYYYGMDV	279
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGVTTYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	280
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGNNFLDWYLQKPGQSPRLLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKR	281
vlCDR1	QSLLYSNGNNF	282
vlCDR2	LGS	283
vlCDR3	MQALQTPPT	284
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGNNFLDWYLQKPGQSPRLLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	285

ES 2 806 800 T3

Figura 38L
CPA.7.015

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QITLKESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLFDFWWDGMDVWGQGTTVTVSS	286
vhCDR1	GFTFSSYG	287
vhCDR2	IRYDGSNK	288
vhCDR3	ARDLFDFWWDGMDV	289
HC longitud completa	QITLKESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLFDFWWDGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	290
Dominio variable ligero (vl)	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSCRVSQSVSSMYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASYRATGIPDRFSGSGSGTDFNLTISRLEP EDFAVYYCQQYVSSPMYTFGLGTKLEIKR	291
vlCDR1	QSVSSMY	292
vlCDR2	GAS	293
vlCDR3	QQYVSSPMYT	294
Cadena ligera long. completa	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSCRVSQSVSSMYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASYRATGIPDRFSGSGSGTDFNLTISRLEP EDFAVYYCQQYVSSPMYTFGLGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	295

Figura 38M
CPA.7.017

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAPGKGLEWMGQIIPLFGTTKYAQKFQGRVTIAADEPTS TAYMELGSLRSEDTAIYYCARDRMAADGMAVFDYWGQGTLVTVSS	296
vhCDR1	GGTFNNYG	297
vhCDR2	IIPLFGTT	298
vhCDR3	ARDRMAADGMAVFDY	299
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAPGKGLEWMGQIIPLFGTTKYAQKFQGRVTIAADEPTS TAYMELGSLRSEDTAIYYCARDRMAADGMAVFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	300
Dominio variable ligero (vl)	QSVLTQPPSVSGTPGQKVIISCSGSSSNIGRHFVFWYQQLPGTAPKLLIYKNDERPSGVPDRFSGSKSGTSASLAVSGLRS EDEADYYCSSWDAALNGVVFGGGTKLTVLG	301
vlCDR1	SSNIGRHF	302
vlCDR2	KND	303
vlCDR3	SSWDAALNGVV	304
Cadena ligera long. completa	QSVLTQPPSVSGTPGQKVIISCSGSSSNIGRHFVFWYQQLPGTAPKLLIYKNDERPSGVPDRFSGSKSGTSASLAVSGLRS EDEADYYCSSWDAALNGVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	305

ES 2 806 800 T3

Figura 38N
CPA.7.018

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEVPMVRGARRYYYYMDVWGKGTTVTVSS	306
vhCDR1	GYTLTELS	307
vhCDR2	FDPEDGET	308
vhCDR3	ATEVPMVRGARRYYYYMDV	309
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEVPMVRGARRYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	310
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLFLAVTPGEPASISCRSSQTLLYINENNYLDWYVQKPGQSPQLLIYLGSTRASGVPDRFSGGGSGTDFTLTI SRVEAEDVGLYYCMQGLQTPPTFGQGTRLEIKR	311
vlCDR1	QTLLYINENNY	312
vlCDR2	LGS	313
vlCDR3	MQGLQTPPT	314
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLFLAVTPGEPASISCRSSQTLLYINENNYLDWYVQKPGQSPQLLIYLGSTRASGVPDRFSGGGSGTDFTLTI SRVEAEDVGLYYCMQGLQTPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	315

ES 2 806 800 T3

Figura 38O
CPA.7.019

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQESGPGLVKSSETLSLTCSVSGGSISNSNYYWGWIRQPPGKGLEWIGGIYYSGSTYYNPSLESRVTISEDTSKNQIS LKLSSVTAADTAVYYCARGAWELSLGDWFDPWGPGTLVTVSS	316
vhCDR1	GGSISNSNYY	317
vhCDR2	IYYSGST	318
vhCDR3	ARGAWELSLGDWFDP	319
HC longitud completa	QVQLQESGPGLVKSSETLSLTCSVSGGSISNSNYYWGWIRQPPGKGLEWIGGIYYSGSTYYNPSLESRVTISEDTSKNQIS LKLSSVTAADTAVYYCARGAWELSLGDWFDPWGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	320
Dominio variable ligero (vl)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDIQWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSVYVVFGGGTQLTVLG	321
vlCDR1	SSNIGAGYD	322
vlCDR2	GNN	323
vlCDR3	QSYDSSLSVYVV	324
Cadena ligera long. completa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDIQWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSVYVVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	325

ES 2 806 800 T3

Figura 38P
CPA.7.021

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFGTSSMNWVRQAPGKGLEWVAVISFDGTEIHYADSVKGRFTISRDNSKST VFLQMNSLRPDDTALYYCAKGSGNIYFYSGMDVWGQGTTVTVSS	326
vhCDR1	GFTFGTSS	327
vhCDR2	ISFDGTEI	328
vhCDR3	AKGSGNIYFYSGMDV	329
HC longitud completa	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFGTSSMNWVRQAPGKGLEWVAVISFDGTEIHYADSVKGRFTISRDNSKST VFLQMNSLRPDDTALYYCAKGSGNIYFYSGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAGQSISGWLAWFQQKPGKAPNLLIYETSTLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQP DDFATYYCQQYYSYPLTFGQGTKVEIKR	331
vlCDR1	QSISGW	332
vlCDR2	ETS	333
vlCDR3	QQYYSYPLT	334
Cadena ligera long. completa	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAGQSISGWLAWFQQKPGKAPNLLIYETSTLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQP DDFATYYCQQYYSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	335

Figura 38Q
CAP.7.022

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGVPAAIGVYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS	336
vhCDR1	GYTLTELS	337
vhCDR2	FDPEDGET	338
vhCDR3	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	339
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGVPAAIGVYYYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	340
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQSPVTFGGGTKVEIKR	341
vlCDR1	QSLLYSNGYNY	342
vlCDR2	LGS	343
vlCDR3	MQALQSPVT	344
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQSPVTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	345

ES 2 806 800 T3

Figura 38R
CPA.7.023

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDSRDGPAARGGYYYYMDVWGQGTTVTVSS	346
vhCDR1	GYTLTELS	347
vhCDR2	FDPEDGET	348
vhCDR3	ATDSRDGPAARGGYYYYMDV	349
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDSRDGPAARGGYYYYMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	350
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLYINGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKR	351
vlCDR1	QSLLYINGYNY	352
vlCDR2	LGS	353
vlCDR3	MQALQTPPT	354
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLYINGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	355

ES 2 806 800 T3

Figura 38S
CPA.7.024

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDAYYYDSSGYYNPDAFDIWGQGTMVTVSS	356
vhCDR1	GGTFSSYA	357
vhCDR2	IIPIFGTA	358
vhCDR3	ARDAYYYDSSGYYNPDAFDI	359
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDAYYYDSSGYYNPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	360
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSSRASGVPDRFSGSVSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGLQTPRTFGRGTKLEIKR	361
vlCDR1	QSLLHSNGYNY	362
vlCDR2	LGS	363
vlCDR3	MQGLQTPRT	364
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSSRASGVPDRFSGSVSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGLQTPRTFGRGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	365

ES 2 806 800 T3

Figura 38T

CPA.7.033

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	366
vhCDR1	GGTFSSSA	367
vhCDR2	IIPIYGIT	368
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	369
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	370
Dominio variable ligero (vl)	ETTLTQSPAFMSATPGDEVNISCKASQDIDDDVSWYQQKPGGAPIFLIQEASTLVPGIPPRFSGSGFGTDFTLTIKNMES EDAAYYFCLQHDNLPLTFGGGTKVDIKR	371
vlCDR1	QDIDDD	372
vlCDR2	EAS	373
vlCDR3	LQHDNLPLT	374
Cadena ligera long. completa	ETTLTQSPAFMSATPGDEVNISCKASQDIDDDVSWYQQKPGGAPIFLIQEASTLVPGIPPRFSGSGFGTDFTLTIKNMES EDAAYYFCLQHDNLPLTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	375

ES 2 806 800 T3

Figura 38U

CPA.7.034

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEDPGPVAGPYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	376
vhCDR1	GYTLTELS	377
vhCDR2	FDPEDGET	378
vhCDR3	ATEDPGPVAGPYYYYGMDV	379
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEDPGPVAGPYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	380
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLVLPVTPGEPASISCRSSQSLLYINGYHYLDWYVQRPGQSPQLLIFLGSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLEIS KVEAEDVGIYFCMQALQTPPTFGGGTKVEIKR	381
vlCDR1	QSLLYINGYHY	382
vlCDR2	LGS	383
vlCDR3	MQALQTPPT	384
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLVLPVTPGEPASISCRSSQSLLYINGYHYLDWYVQRPGQSPQLLIFLGSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLEIS KVEAEDVGIYFCMQALQTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	385

Figura 38V

CPA.7.036

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	386
vhCDR1	GGTFSSSA	387
vhCDR2	IIPIYGIT	388
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	389
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	390
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRPSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIHTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQRLQFPLTFGGGTKVEIKR	391
vlCDR1	QSLLDSDDGNTY	392
vlCDR2	TLS	393
vlCDR3	MQRLQFPLT	394
Cadena ligera long. completa	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRPSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIHTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQRLQFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	395

ES 2 806 800 T3

Figura 38W

CPA.7.040

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGVPAAIGVYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS	396
vhCDR1	GYTLTELS	397
vhCDR2	FDPEDGET	398
vhCDR3	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	399
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGVPAAIGVYYYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	400
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYWGSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQAVQNPPTFGQGTKVDIKR	401
vlCDR1	QSLLYRNGYNY	402
vlCDR2	WGS	403
vlCDR3	MQAVQNPPT	404
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYWGSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQAVQNPPTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	405

Figura 38X

CPA.7.046

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	406
vhCDR1	GGTFSSSA	407
vhCDR2	IIPIYGIT	408
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	409
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	410
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPAFLSVTPGERVTLSCKASQTMNNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASTRATDTPPRFSGSGSGTEFTLTISSV QSEDFALYYCQQYGDWLPITFGQGTRLEIKR	411
vlCDR1	QTMNNY	412
vlCDR2	DAS	413
vlCDR3	QQYGDWLPIT	414
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPAFLSVTPGERVTLSCKASQTMNNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASTRATDTPPRFSGSGSGTEFTLTISSV QSEDFALYYCQQYGDWLPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	415

ES 2 806 800 T3

Figura 38Y

CPA.7.047

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATAFPEATISYYYYMDVWGKGTTVTVSS	416
vhCDR1	GYTLTELS	417
vhCDR2	FDPEDGET	418
vhCDR3	ATAFPEATISYYYYMDV	419
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATAFPEATISYYYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	420
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYWGSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQAVQNPPTFGQGTKVEIKR	421
vlCDR1	QSLLYRNGYNY	422
vlCDR2	WGS	423
vlCDR3	MQAVQNPPT	424
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYWGSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQAVQNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	425

ES 2 806 800 T3

Figura 38Z

CPA.7.049

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	426
vhCDR1	GGTFSSSA	427
vhCDR2	IIPIYGIT	428
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	429
HC longitud completa	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	430
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASMSCRSSRSLLDSDDGNTHLDWYLQKPGQSPQLLIQSLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTL EISRVEAEDVGIYYCMQRKEFPLTFGGGTKVEIKR	431
vlCDR1	RSLLDSDDGNTH	432
vlCDR2	SLS	433
vlCDR3	MQRKEFPLT	434
Cadena ligera long. completa	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASMSCRSSRSLLDSDDGNTHLDWYLQKPGQSPQLLIQSLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTL EISRVEAEDVGIYYCMQRKEFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	435

ES 2 806 800 T3

Figura 38AA

CPA.7.050

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGPWYYDSSGYSSYAYYMDVWGQGTTVTVSS	436
vhCDR1	GGTFSSYA	437
vhCDR2	IIPIFGTA	438
vhCDR3	ARGPWYYDSSGYSSYAYYMDV	439
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGPWYYDSSGYSSYAYYMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	440
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSDGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALHTPGVTFGGGTKVEIKR	441
vlCDR1	QSLLHSDGYNY	442
vlCDR2	LGS	443
vlCDR3	MQALHTPGVT	444
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSDGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALHTPGVTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	445

Figura 39A
CPA.7.028

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVTGGSISSSSYYWAWIRQPPGKGLEWIGGIYYSGSTYYNVSLESRVTISQDTSKNQFS LKLTSVTAADTAVYYCARGAWELRLGDWFDPWGQGTLVTVSS	446
vhCDR1	GGSISSSSYY	447
vhCDR2	IYYSGST	448
vhCDR3	ARGAWELRLGDWFDP	449
HC longitud completa	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVTGGSISSSSYYWAWIRQPPGKGLEWIGGIYYSGSTYYNVSLESRVTISQDTSKNQFS LKLTSVTAADTAVYYCARGAWELRLGDWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
Dominio variable ligero (vl)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDIQWYQQLPGTAPKLLIYGYSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSVYVVFGGGTQLTVLGQPKAA	451
vlCDR1	SSNIGAGYD	452
vlCDR2	GYS	453
vlCDR3	QSYDSSLSVYVV	454
Cadena ligera long. completa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDIQWYQQLPGTAPKLLIYGYSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSVYVVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	455

ES 2 806 800 T3

Figura 39B
CPA.7.030

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASRFTFEDYAMHWVRQPPGKGLEWVSGISWKSGGINYADSVKGRFTISRDNAQ NSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKDPTLVATDRAFNIWGQGTMVTVSS	456
vhCDR1	RFTFEDYA	457
vhCDR2	ISWKSGGI	458
vhCDR3	VKDPTLVATDRAFNI	459
HC longitud completa	QVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASRFTFEDYAMHWVRQPPGKGLEWVSGISWKSGGINYADSVKGRFTISRDNAQ NSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKDPTLVATDRAFNIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	460
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQYLQTPDTFGQGTKLEIKRAAPS	461
vlCDR1	QSLLHSNGYNY	462
vlCDR2	LGS	463
vlCDR3	MQYLQTPDT	464
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQYLQTPDTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	465

ES 2 806 800 T3

Figura 39C
CPA.7.041

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTIITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	466
vhCDR1	GGTFSSSA	467
vhCDR2	IIPIYGIT	468
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	469
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTIITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	470
Dominio variable ligero (vl)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQNIDSSLHWYQQKPGQSPKLLINYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIDSLEPE DAATYFCHQSSSLPLTFGGGTKVEIRRTVAAPS	471
vlCDR1	QNIDSS	472
vlCDR2	YAS	473
vlCDR3	HQSSSLPLT	474
Cadena ligera long. completa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDIQWYQQLPGTAPKLLIYGYSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSVVVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	475

Figura 39D
CPA.7.016

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTSTA YMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	476
vhCDR1	GGTFSSSA	477
vhCDR2	IIPIYGIT	478
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	479
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTSTA YMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	480
Dominio variable ligero (vl)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSE DFAVYYCQQYDDWPQTFGQGTRLEIKRTVAAPS	481
vlCDR1	QSVSSY	482
vlCDR2	DAS	483
vlCDR3	QQYDDWPQT	484
Cadena ligera long. completa	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSE DFAVYYCQQYDDWPQTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	485

ES 2 806 800 T3

Figura 39E
CPA.7.020

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDES TSTAYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	486
vhCDR1	GGTFSSSA	487
vhCDR2	IIPIYGIT	488
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	489
HC longitud completa	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDES TSTAYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	490
Dominio variable ligero (vl)	EIVMTQSPATLSLSTGERATLFCRTSQNVYGEVAWYQQKPGQAPRLLIYDTFERAAGIPAKFSGSGSGTDFTLTISR VEPEDFAVYYCQQRRDWPITFGQGTRLEIKRTVAAPS	491
vlCDR1	QNVYGE	492
vlCDR2	DTF	493
vlCDR3	QQRRDWPIT	494
Cadena ligera long. completa	EIVMTQSPATLSLSTGERATLFCRTSQNVYGEVAWYQQKPGQAPRLLIYDTFERAAGIPAKFSGSGSGTDFTLTISR VEPEDFAVYYCQQRRDWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	495

Figura 39F
CPA.7.038

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	496
vhCDR1	GGTFSSSA	497
vhCDR2	IIPIYGIT	498
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	499
HC longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	500
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASRDISDSLSWYQQKPGKAPKLLIFDASNLKTGVSSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPE DIATYYCHQYDNLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS	501
vlCDR1	RDISDS	502
vlCDR2	DAS	503
vlCDR3	HQYDNLPLT	504
Cadena ligera long. completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASRDISDSLSWYQQKPGKAPKLLIFDASNLKTGVSSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPE DIATYYCHQYDNLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	505

Figura 39G
CPA.7.044

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	506
vhCDR1	GGTFSSSA	507
vhCDR2	IIPIYGIT	508
vhCDR3	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	509
HC longitud completa	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSAISWVRQAPGQGFEWMGGIIPIYGITDYAQKFQGRVTITTDESTST AYMELSSLTSEDTAVYYCARDDTARRVRGVPYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	510
Dominio variable ligero (vl)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVTTFLAWYQQKPGQAPRLLITDASNRATGIPGRFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCHQHTNWPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS	511
vlCDR1	ESVTTF	512
vlCDR2	DAS	513
vlCDR3	HQHTNWPLT	514
Cadena ligera long. completa	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVTTFLAWYQQKPGQAPRLLITDASNRATGIPGRFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCHQHTNWPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	515

ES 2 806 800 T3

Figura 39H
CPA.7.045

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEVGYCSGGSCYISYYYGMDVWGQGTTVTVSS	516
vhCDR1	GYTLTELS	517
vhCDR2	FDPEDGET	518
vhCDR3	ATEVGYCSGGSCYISYYYGMDV	519
HC longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEVGYCSGGSCYISYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	520
Dominio variable ligero (vl)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGHNFLDWYVQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPS	521
vlCDR1	QSLLYRNGHNF	522
vlCDR2	LGS	523
vlCDR3	MQALQTPPT	524
Cadena ligera long. completa	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGHNFLDWYVQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	525

Figura 40A

CDRs

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.001	GGTFSSYA	526	IIPIFGTA	527	AREEVSSPYGMDV	528	TGAVTSGHY	529	DTG	530	LLSYSGASWV	531
CPA.7.002	GGTFSSSA	532	IIPIYGIT	533	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	534	QGIGNY	535	SAS	536	QQLKDYPIT	537
CPA.7.003	GFSLSHFS	538	FDPEEGGT	539	ATGIWYSSGWPVDY	540	QSLLDSSGYNY	541	LGS	542	MQALQTPIT	543
CPA.7.004	GYTLTELS	544	FDPEDGET	545	ATVSRVRGVINYYYYMDV	546	QSLLYRNGNNY	547	LGS	548	MQALQTPPT	549
CPA.7.005	GGTFSSSA	550	IIPIYGIT	551	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	552	QSVDSS	553	DAS	554	QQYKDWPFT	555
CPA.7.006	GGTFGTYA	556	ITPISATI	557	ARGFEYSDGLLDD	558	QSLFYSDDGNTY	559	RLS	560	MQHMEFPLT	561
CPA.7.007	GGSISSSSYY	562	IYYSGST	563	ARGAWELRLGDWFDP	564	SSNIGAGYD	565	GNN	566	QSYDSSLSIYVV	567
CPA.7.008	SGSISSTNW	568	IYHSGST	569	ARVGPAAIYY	570	SNNVGYEG	571	RNN	572	SAWDSSLNAVV	573
CPA.7.009	GYTLTELS	574	FDPEDGET	575	ATAKPGIAVAGQNYYYYYMDV	576	QSLLYRNGNNY	577	LGS	578	MQALQTPPT	579
CPA.7.010	GFTFSSYA	580	ISYDGSNK	581	ASSPIGYSYGYWGGMDV	582	SGIDVRTNK	583	FQSDSDK	584	LIWHTSGWV	585
CPA.7.011	GYTLTELS	586	FDPEDGET	587	ATGPAAAGVGYYYYMDV	588	QSLLYRNGYNY	589	LGS	590	MQALQTPPT	591
CPA.7.012	GFTFSSYA	592	ISYDGSNK	593	ARDVMVYCSSTSCYFYGMDV	594	QDIRDY	595	DAS	596	QQFENLPIT	597
CPA.7.013	GYTLTELS	598	FDPEDGET	599	ATGGYSSGFNYYYYYMDV	600	QSLLYRNGNNY	601	LGS	602	MQALQTPPT	603

Figura 40B

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.014	GYTLTELS	604	FDPEDGET	605	ATGVTTYYYYGMDV	606	QSLLYSNGNNF	607	LGS	608	MQALQTPPT	609
CPA.7.015	GFTFSSYG	610	IRYDGSNK	611	ARDLFDFWWDGMDV	612	QSVSSMY	613	GAS	614	QQYVSSPMYT	615
CPA.7.016	GGTFSSSA	616	IIPIYGIT	617	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	618	QSVSSY	619	DAS	620	QQYDDWPQT	621
CPA.7.017	GGTFNNYG	622	IIPLFGTT	623	ARDRMAADGMAVFDY	624	SSNIGRHF	625	KND	626	SSWDAALNGVV	627
CPA.7.018	GYTLTELS	628	FDPEDGET	629	ATEVPMVRGARRYYYYMDV	630	QTLLYINENNY	631	LGS	632	MQGLQTPPT	633
CPA.7.019	GGSISNSNYY	634	IYYSGST	635	ARGAWELSLGDWFDP	636	SSNIGAGYD	637	GNN	638	QSYDSSLSVYVV	639
CPA.7.020	GGTFSSSA	640	IIPIYGIT	641	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	642	QNVYGE	643	DTF	644	QQRRDWPIT	645
CPA.7.021	GFTFGTSS	646	ISFDGTEI	647	AKGSGNIYFYSGMDV	648	QSISGW	649	ETS	650	QQYYSYPLT	651
CPA.7.022	GYTLTELS	652	FDPEDGET	653	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	654	QSLLYSNGYNY	655	LGS	656	MQALQSPVT	657
CPA.7.023	GYTLTELS	658	FDPEDGET	659	ATDSRDGPAARGGYYYYMDV	660	QSLLYINGYNY	661	LGS	662	MQALQTPPT	663
CPA.7.024	GGTFSSYA	664	IIPIFGTA	665	ARDAYYYDSSGYYNPDAFDI	666	QSLLHSNGYNY	667	LGS	668	MQGLQTPRT	669
CPA.7.025	GFSLTSGGMS	670	IDWNDDK	671	ARIRGMTWGFDS	672	QSVSSSY	673	GAS	674	QQYGTTPFA	675
CPA.7.026	GYTFTAYY	676	INPNSGGT	677	ARDGAFYYGSENYYNAGWFDP	678	QSLLSGNGYNY	679	LGS	680	MQALKSPLT	681
CPA.7.027	GYTFTNYY	682	INPSGGIT	683	ARAGLGYNWNYAPSGMDV	684	SSDVGGYNY	685	EVS	686	SSYAGSNNLV	687
CPA.7.028	GGSISSSSYY	688	IYYSGST	689	ARGAWELRLGDWFDP	690	SSNIGAGYD	691	GYS	692	QSYDSSLSVYVV	693

ES 2 806 800 T3

Figura 40C

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.029	GFTFDDYA	694	ISWNSGSI	695	AKDVNRILVAGMVDY	696	QSLLHSNGYNY	697	LGS	698	MQGLQTPIT	699
CPA.7.030	RFTFEDYA	700	ISWKSGGI	701	VKDPTLVATDRAFNI	702	QSLLHSNGYNY	703	LGS	704	MQYLQTPDT	705
CPA.7.031	GGTFSSSA	706	IIPIYGIT	707	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	708	QSLLDSDDGNIH	709	TLS	710	MQRKEFPLT	711
CPA.7.032	GFTFSSYG	712	ISYDGSNK	713	AKEDRLRFLEWLFYGMDV	714	HDIYTY	715	DAS	716	QQYDNHPPEVT	717
CPA.7.033	GGTFSSSA	718	IIPIYGIT	719	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	720	QDIDDD	721	EAS	722	LQHDNLPLT	723
CPA.7.034	GYTLTELS	724	FDPEDGET	725	ATEDPGPVAGPYYYYGMDV	726	QSLLYINGYHY	727	LGS	728	MQALQTPPT	729
CPA.7.035	GYMFTNYP	730	INAGTGNT	731	AREGMFYYGLESYYKGGWFDP	732	QSLLHRNGYNY	733	LAS	734	MQALQTPLT	735
CPA.7.036	GGTFSSSA	736	IIPIYGIT	737	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	738	QSLLDSDDGNTY	739	TLS	740	MQRLQFPLT	741
CPA.7.037	TYTFTTYY	742	IYPSGGNT	743	VRDQNYYYSAMDV	744	QDIRNY	745	DAS	746	QQFENLPIT	747
CPA.7.038	GGTFSSSA	748	IIPIYGIT	749	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	750	RDISDS	751	DAS	752	HQYDNLPLT	753
CPA.7.039	GFNFRGYA	754	ISGSGGTT	755	AQSYAQIGYGGHIDH	756	SGIDVATYM	757	YKSDSDK	758	LIWHGSHYV	759
CPA.7.040	GYTLTELS	760	FDPEDGET	761	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	762	QSLLYRNGYNY	763	WGS	764	MQAVQNPPT	765
CPA.7.041	GGTFSSSA	766	IIPIYGIT	767	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	768	QNIDSS	769	YAS	770	HQSSSLPLT	771
CPA.7.042	GGTFSSSA	772	IIPIYGIT	773	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	774	QSVYNNY	775	DAS	776	QQYNSWPPYT	777
CPA.7.043	GGTFSSYA	778	IIPIFGTA	779	ARDAYYYDSSGYYNPDAFDI	780	QSLLYSNGYNY	781	LGS	782	MQARQTPYT	783

ES 2 806 800 T3

Figura 40D

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.044	GGTFSSSA	784	IIPIYGIT	785	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	786	ESVTTF	787	DAS	788	HQHTNWPLT	789
CPA.7.045	GYTLTELS	790	FDPEDGET	791	ATEVGYCSGGSCYISYYYGMDV	792	QSLLYRNGHNF	793	LGS	794	MQALQTPPT	795
CPA.7.046	GGTFSSSA	796	IIPIYGIT	797	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	798	QTMNNY	799	DAS	800	QQYGDWLPIT	801
CPA.7.047	GYTLTELS	802	FDPEDGET	803	ATAFPEATISYYYYMDV	804	QSLLYRNGYNY	805	WGS	806	MQAVQNPPT	807
CPA.7.049	GGTFSSSA	808	IIPIYGIT	809	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	810	RSLLDSDDGNTH	811	SLS	812	MQRKEFPLT	813
CPA.7.050	GGTFSSYA	814	IIPIFGTA	815	ARGPWYYDSSGYSSYAYYMDV	816	QSLLHSDGYNY	817	LGS	818	MQALHTPGVT	819

Figura 41A

CHA.7.502

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	DVQLVESGGDLVQPGGSRKLSCTASGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGS STIYYADTVKGRFTISRDNPENTLFLQMTSLRSEDTAMYYCTRLDYYTNSYSMDHWG QGTSVTVSS	820
vhCDR1	GFTFSNFG	821
vhCDR2	ISSGSSTI	822
vhCDR3	TRLDYYTNSYSMDH	823
Dominio variable ligero (vl)	QIVLTQSPALMSASPGEKVTLTCSASSSLPYIYWYQQKPGSSPKPWIYLTSNLASGVP ARFSGSRSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIK	824
vlCDR1	SSLPY	825
vlCDR2	LTS	826
vlCDR3	QQWSSNPFT	827

Figura 41B

CHA.7.503

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSNWMHWVKQRPGQGLEWIGYINP SNGYTECNQKFRDKATLSADKSSSTAYMQLNSLTSADSAVYYCALMISAWLPYWG QGTLVTVSA	828
vhCDR1	GYTFTSNW	829
vhCDR2	INPSNGYT	830
vhCDR3	ALMISAWLPY	831
Dominio variable ligero (vl)	DIVLTQSPASLAISLGQRATISCRASQSVSASSYSYVHWYQQKPGQPPKLLIKYASSLE SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCLHTWEIPYTFGGGTKLEIK	832
vlCDR1	QSVSASSYSY	833
vlCDR2	YAS	834
vlCDR3	LHTWEIPYT	835

Figura 41C

CHA.7.506

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGAELTRPGASVNLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTRFNQKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCATYYRYDDYWGQGTTLTVSS	836
vhCDR1	GYTFTSYW	837
vhCDR2	IYPGDGDT	838
vhCDR3	ATYYRYDDY	839
Dominio variable ligero (vl)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPYTFGGGTKLEIK	840
vlCDR1	SSVSY	841
vlCDR2	DTS	842
vlCDR3	QQWSSNPYT	843

Figura 41D

CHA.7.508

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLQQSGPDLVKPGASMKISCKASGYTFIDYNIHWVKQSQGKSLDWIGYIYPYNG GTGYNQKFKNKATLTVDSSSSTAYMEVRSLTFEDSAVYFCAREADYYGNRGQFDYW GQGTLVTVSA	844
vhCDR1	GYTFIDYN	845
vhCDR2	IYPYNGGT	846
vhCDR3	AREADYYGNRGQFDY	847
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIFSNLAWYQQKQGKSPQLLVYGEANLAD GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGNYYCQHFWGTPYTFGGGTTLEIK	848
vlCDR1	ENIFSN	849
vlCDR2	GEA	850
vlCDR3	QHFWGTPYT	851

Figura 41E

CHA.7.510

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLNTSGTGVGWIRQPSGKGLEWLTHIWWN DNKFYNTFLKSRLTISKETSNNQVFLKIASVDTADAATYYCARMAYGNLWFVNWGQ GTLVAVST	852
vhCDR1	GFSLNTSGTG	853
vhCDR2	IWWNDNK	854
vhCDR3	ARMAYGNLWFVN	855
Dominio variable ligero (vl)	DIVLTQSPASLAVSLGQRASISCRASRSVTISGYSYMYWYQQKPGQPPRLLFYLASNL ASGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAIYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK	856
vlCDR1	RSVTISGYSY	857
vlCDR2	LAS	858
vlCDR3	QHSRELPYT	859

Figura 41F

CHA.7.512

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QIQLVQSGPELKKPRETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAFSLEASASSAYLQINILKDEDTATYFCARSRGGYYEDYYALDYWGQGTSVTVSS	860
vhCDR1	GYTFTDYS	861
vhCDR2	INTETGEP	862
vhCDR3	ARSRGGYYEDYYALDY	863
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPASLSASVGESVTITCRASGNIHYYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWISPPTFGGGTKLEIK	864
vlCDR1	GNIHYY	865
vlCDR2	NAK	866
vlCDR3	QHFWISPPT	867

Figura 41G

CHA.7.514

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLRQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIDWVKQRPEQGLDWIGRIDPANG NTKYDPKFQGKATIITDTSSNTAYLQLSNLTSEDTAVYYCARYGSYPYFDYWGRGTTL AVSS	868
vhCDR1	GFNIKDTY	869
vhCDR2	IDPANGNT	870
vhCDR3	ARYGSYPYFDY	871
Dominio variable ligero (vl)	SIVMTQTPKFLLISAGDRVTITCKASQSVRNDVAWYQQKPGQSPKLLMYYASNRYT GVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPPTFGGGTKLEIK	872
vlCDR1	QSVRND	873
vlCDR2	YAS	874
vlCDR3	QQDYSSPPT	875

Figura 41H

CHA.7.516

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKVSGYTFTDYVMHWVKQSHAKSLEWIGIISPYSG NTNYNQNFKGKATMTVDKSSSTAYMALARLTSEDSAIYYCAREGDLPMFAYWGQG TLVTVSA	876
vhCDR1	GYTFTDYV	877
vhCDR2	ISPYSGNT	878
vhCDR3	AREGDLPMFAY	879
Dominio variable ligero (vl)	QIVLTQSPTIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQNPGSSPRLLIYDTSILASGVPF RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWTSYPLTFGSGTKLELK	880
vlCDR1	SSVSY	881
vlCDR2	DTS	882
vlCDR3	QQWTSYPLT	883

Figura 41I

CHA.7.518

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVKQSHGKSLEWIGYIYPYIGGS GYNQKFKSKATLSADNPSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREDKTARNAMDYWGQG TPVTVSS	884
vhCDR1	GYTFTDYN	885
vhCDR2	IYPYIGGS	886
vhCDR3	AREDKTARNAMDY	887
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTIICRVSENIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYEATNLAEG VPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK	888
vlCDR1	ENIYSN	889
vlCDR2	EAT	890
vlCDR3	QHFWGTPYT	891

Figura 41J

CHA.7.520_1

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARHYRYPPYAMDYWGQGTSVTVSS	892
vhCDR1	GYSITSDYA	893
vhCDR2	ISYSGST	894
vhCDR3	ARHYRYPPYAMDY	895
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSTPFTFGSGTKLEIK	896
vlCDR1	QSLLNSSNQKNY	897
vlCDR2	FAS	898
vlCDR3	QQHYSTPFT	899

Figura 41K

CHA.7.520_2

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSFGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGT TVYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQTNDTAIYYCARKRGNFYVMDYWGQGT SVTVSS	900
vhCDR1	GFSLTSFG	901
vhCDR2	IWSGGTT	902
vhCDR3	ARKRGNFYVMDY	903
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVY FASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSTPFTFGSGTKLEIK	904
vlCDR1	QSLLNSSNQKNY	905
vlCDR2	FAS	906
vlCDR3	QQHYSTPFT	907

Figura 41L

CHA.7.522

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQPGSELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWVHWVRQRHGQGLEWIGNVYPG SGSTNYDEKFKSKGTLTVDTSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCTRGVLRFPLDYWGQG TTLTVSS	908
vhCDR1	GYTFTSYW	909
vhCDR2	VYPGSGST	910
vhCDR3	TRGVLRFPLDY	911
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQRPGQSPHLLIYRMS NLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK	912
vlCDR1	KSLLHSNGNTY	913
vlCDR2	RMS	914
vlCDR3	MQHLEYPLT	915

Figura 41M

CHA.7.524

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYKFPDYVMHWVKQSHAKSLEWIGIISIYSG NTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAREGDLPMFAYWGQG TLVTVSA	916
vhCDR1	GYKFPDYV	917
vhCDR2	ISIYSGNT	918
vhCDR3	AREGDLPMFAY	919
Dominio variable ligero (vl)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCNASSSVSYMYWYQQKPISSPRLLIYDTSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTIGRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKVEVK	920
vlCDR1	SSVSY	921
vlCDR2	DTS	922
vlCDR3	QQWSSYPLT	923

Figura 41N

CHA.7.526

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTAYNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGDG NTDYNSPLKSRLTISKDNSKSQVFLKMDSLQTDDTARYYCARDLKVRRDSPYTMDY WGQGTSVTVSS	924
vhCDR1	GFSLTAYN	925
vhCDR2	IWGDGNT	926
vhCDR3	ARDLKVRRDSPYTMDY	927
Dominio variable ligero (vl)	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WASNRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLEIK	928
vlCDR1	QSVLYSSNQKNY	929
vlCDR2	WAS	930
vlCDR3	HQYLSSYT	931

Figura 410

CHA.7.527

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSLTSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGGTTYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLTSVTTEDTATYYCARRGSGTTVVGDWYFDVWGAGTTVTVSS	932
vhCDR1	GYSLTSDYA	933
vhCDR2	ITYSGGT	934
vhCDR3	ARRGSGTTVVGDWYFDV	935
Dominio variable ligero (vl)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSFNQKYYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTPTISSVTAEDLAVYYCQQFYTYPYTFGGGTKLEMK	936
vlCDR1	QSLLYSFNQKYY	937
vlCDR2	WAS	938
vlCDR3	QQFYTYPYT	939

Figura 41P

CHA.7.528

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQVQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTKSNMHWVKQSHGKSLEWIGYIYPYNG GTGYNQNFKSKATLTVDISSSTAYMELRSLTLEDSAVYLCAREADYYGNRGQFDYW GQGTLVTVSA	940
vhCDR1	GYTFTKSN	941
vhCDR2	IYPYNGGT	942
vhCDR3	AREADYYGNRGQFDY	943
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNIFSNLAWYHQKQGKSPHLLVYGATNLAD GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGDYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK	944
vlCDR1	DNIFSN	945
vlCDR2	GAT	946
vlCDR3	QHFWGTPYT	947

Figura 41Q

CHA.7.530

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGAELMRPGTSVKVSCKASGYAFTNHLIEWIKQRPGQGLEWIGVINPGSDSTDYNEKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARSLYYNSWFVYWGQGTLVTVSA	948
vhCDR1	GYAFTNHL	949
vhCDR2	INPGSDST	950
vhCDR3	ARSLYYNSWFVY	951
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKRGKSPQLLVYNAKTLVEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPYTFGGGTKLEIK	952
vlCDR1	ENIYSY	953
vlCDR2	NAK	954
vlCDR3	QHHYGTPYT	955

Figura 41R

CHA.7.534

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFSIRDTYIHWVKQRPEQGLDWIGKIDPANG KSEYDPKFQGRATMTTDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTRYGYYPYFDVWGAGTT VTVFS	956
vhCDR1	GFSIRDTY	957
vhCDR2	IDPANGKS	958
vhCDR3	TRYGYYPYFDV	959
Dominio variable ligero (vl)	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVAITCKASQSVRHDVVWYQQKPGQSPKLLIYYASSRYTG VPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLALYFCLQDFSSPWTFGGGTKLEIK	960
vlCDR1	QSVRHD	961
vlCDR2	YAS	962
vlCDR3	LQDFSSPWT	963

Figura 41S

CHA.7.535

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTKNTMHWVRQSHGKSLEWIGGINPNSGGASFNQKFMGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDGYDGDWFFDVWGAGTTVTVSS	964
vhCDR1	GYTFTKNT	965
vhCDR2	INPNSGGA	966
vhCDR3	ARDGYDGDWFFDV	967
Dominio variable ligero (vl)	DIQMNQSPFSLSASLGDTVTITCHASQNIYVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASDLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLNISSLQPEDIATYYCQQGQSYPRTFGGGTKLEIK	968
vlCDR1	QNIYVW	969
vlCDR2	KAS	970
vlCDR3	QQGQSYPRT	971

Figura 41T

CHA.7.537

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIGHGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGNTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYFCAVNSAMDYWGQGTAVTVSS	972
vhCDR1	GFSLIGHG	973
vhCDR2	IWGDGNT	974
vhCDR3	AVNSAMDY	975
Dominio variable ligero (vl)	NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLNCTASENVASFVSWYQQKPEQSPKLLIYGTSNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLGDYHCGQSYNYPFTFGSGTKLEIE	976
vlCDR1	ENVASF	977
vlCDR2	GTS	978
vlCDR3	GQSYNYPFT	979

Figura 41U

CHA.7.538_1

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGAELVRPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSG GIYYNDKFKVKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARSETHDTWFAYWGQG TLVTVSA	980
vhCDR1	GYAFTNYL	981
vhCDR2	INPGSGGI	982
vhCDR3	ARSETHDTWFAY	983
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSQKFISTSVGDRVSITCKASQSVRIAVAWFQQKPGQSPKALIYLASTRHTG VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPYTFGGGTKLEIKR	984
vlCDR1	QSVRIA	985
vlCDR2	LAS	986
vlCDR3	LQHWNYPYT	987

Figura 41V

CHA.7.538_2

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTFTNYWIGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSA	988
vhCDR1	GYTFTNYW	989
vhCDR2	IYPGGGYT	990
vhCDR3	ASPYYGSSYGFAF	991
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSQKFISTSVGDRVSITCKASQSVRIAVAWFQQKPGQSPKALIYLASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPYTFGGGTKLEIKR	992
vlCDR1	QSVRIA	993
vlCDR2	LAS	994
vlCDR3	LQHWNYPYT	995

Figura 41W

CHA.7.543

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLSGYGIKWVRQPPGKGLEWLGTIWGDGS TDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMTSLQTDDTARYYCASDSLGITFGYWGQGTLV TVSA	996
vhCDR1	GFSLSGYG	997
vhCDR2	IWGDGST	998
vhCDR3	ASDSLGITFGY	999
Dominio variable ligero (vl)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPLTFGAGTKLELK	1000
vlCDR1	QDISNY	1001
vlCDR2	YTS	1002
vlCDR3	QQGNTLPLT	1003

Figura 41X

CHA.7.544

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYAITWVRQPPGKGLEWLGVIWPGGGT NYNSALKSRLSISKDNSKSHLFLKMNSLQTDDTARYYCVRSYDGYLDWYFDVWGTG TTVTVSS	1004
vhCDR1	GFSLTSYA	1005
vhCDR2	IWPGGGT	1006
vhCDR3	VRSYDGYLDWYFDV	1007
Dominio variable ligero (vl)	NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLSCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYT GVPDRFTGSGSATDFTLIISSVQAEDLSDYHCGQSYSYPYTFGGGTKLEII	1008
vlCDR1	ENVGTY	1009
vlCDR2	GAS	1010
vlCDR3	GQSYSYPYT	1011

Figura 41Y

CHA.7.545

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QIQLVQSGPDLKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGRGLKWMGWINTYSGVSTFPDDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDSATYFCARLGMGSTTGAGYFDVWGTGTTVTVSS	1012
vhCDR1	GYTFTTYG	1013
vhCDR2	INTYSGVS	1014
vhCDR3	ARLGMGSTTGAGYFDV	1015
Dominio variable ligero (vl)	DIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSSWYLHWYQQKSGASPKLWIYGTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYRSDPYTFGSGTKLEIK	1016
vlCDR1	SSVSSWY	1017
vlCDR2	GTS	1018
vlCDR3	QQYRSDPYT	1019

Figura 41Z

CHA.7.546

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVSTYADDFEGRFAFSLETSVSTAYLQINNLKNEDTATYFCARLGRGSTTGAGYLDVWGTGTTVTVSS	1020
vhCDR1	GYTFTTYG	1021
vhCDR2	INTYSGVS	1022
vhCDR3	ARLGRGSTTGAGYLDV	1023
Dominio variable ligero (vl)	DIVLTQSPAIMSASPGEKVSMTCSASSSVSSWYLHWYQQKSGASPKLWIYGTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYHSDPYTFGSGTKLEIK	1024
vlCDR1	SSVSSWY	1025
vlCDR2	GTS	1026
vlCDR3	QQYHSDPYT	1027

Figura 41AA

CHA.7.547

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QIQLVQSGPDLKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGRGLKWMGWINTYS GVSTFPDDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDSATYFCARLGMGSTTGAGYFDV WGTGTTVTVSS	1028
vhCDR1	GYTFTTYG	1029
vhCDR2	INTYSGVS	1030
vhCDR3	ARLGMGSTTGAGYFDV	1031
Dominio variable ligero (vl)	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTLSCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYYTSNLAPG VPARFSGSGSGNSYSLTISSVEGEDAATYYCQQFTSSPWTFGGGTKLEIK	1032
vlCDR1	SSVNY	1033
vlCDR2	YTS	1034
vlCDR3	QQFTSSPWT	1035

Figura 41BB

CHA.7.548

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYSMNWVKQSHGKSLEWIGDITPNNG SPNYNQKFKDKATLTVDKSSSTVYMELRSLTSEDSAVYYCASLFFDYWGHGTTLTVSS	1036
vhCDR1	GYTFTDYS	1037
vhCDR2	ITPNNGSP	1038
vhCDR3	ASLFFDY	1039
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYG ASTRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVQAEDLAVYYCQNDHTYPYTFGGGTKLEIK	1040
vlCDR1	QSLLNSGNQKNY	1041
vlCDR2	GAS	1042
vlCDR3	QNDHTYPYT	1043

Figura 41CC

CHA.7.549

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGFTFTTHWMHWVRQRPGQGLEWIGNIYPS NGGSNYNEKFKTKATLTVDRSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARRVNWDGYYFDYW GQGTTLTVSS	1044
vhCDR1	GFTFTTHW	1045
vhCDR2	IYPSNGGS	1046
vhCDR3	ARRVNWDGYYFDY	1047
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRY SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK	1048
vlCDR1	QNVGTN	1049
vlCDR2	SAS	1050
vlCDR3	QQYNSYPLT	1051

Figura 41DD

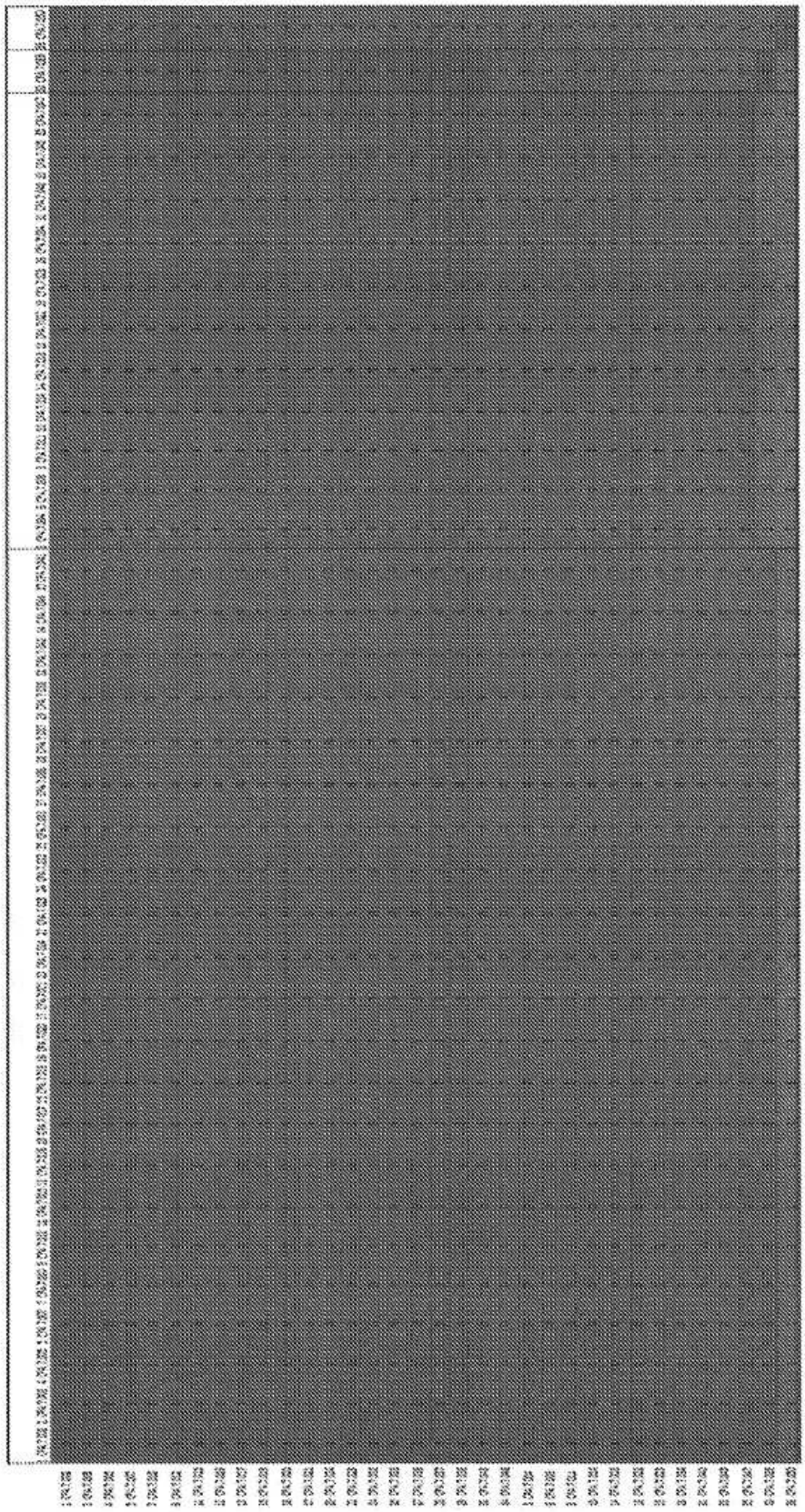
CHA.7.550

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio variable pesado (vh)	QVQLQESGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQRPGQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKAALTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRGLPYFFDYWGQGTTLTVSS	1052
vhCDR1	GYTFTSYW	1053
vhCDR2	INPSNGGT	1054
vhCDR3	ARRGLPYFFDY	1055
Dominio variable ligero (vl)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKGSQNVGYNVAWYQQKPGQSPKALVYSASDRHSGVPDRFAGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELK	1056
vlCDR1	QNVGYN	1057
vlCDR2	SAS	1058
vlCDR3	QQYNSYPLT	1059

Figura 42

1	2	3	4
CPA.7.002	CPA.7.004	CPA.7.039	CPA.7.050
CPA.7.003	CPA.7.009		
CPA.7.005	CPA.7.011		
CPA.7.007	CPA.7.014		
CPA.7.010	CPA.7.018		
CPA.7.012	CPA.7.022		
CPA.7.015	CPA.7.023		
CPA.7.016	CPA.7.034		
CPA.7.017	CPA.7.040		
CPA.7.019	CPA.7.045		
CPA.7.020	CPA.7.047		
CPA.7.021			
CPA.7.024			
CPA.7.028			
CPA.7.032			
CPA.7.033			
CPA.7.036			
CPA.7.037			
CPA.7.038			
CPA.7.043			
CPA.7.046			
CPA.7.041			

Figura 43



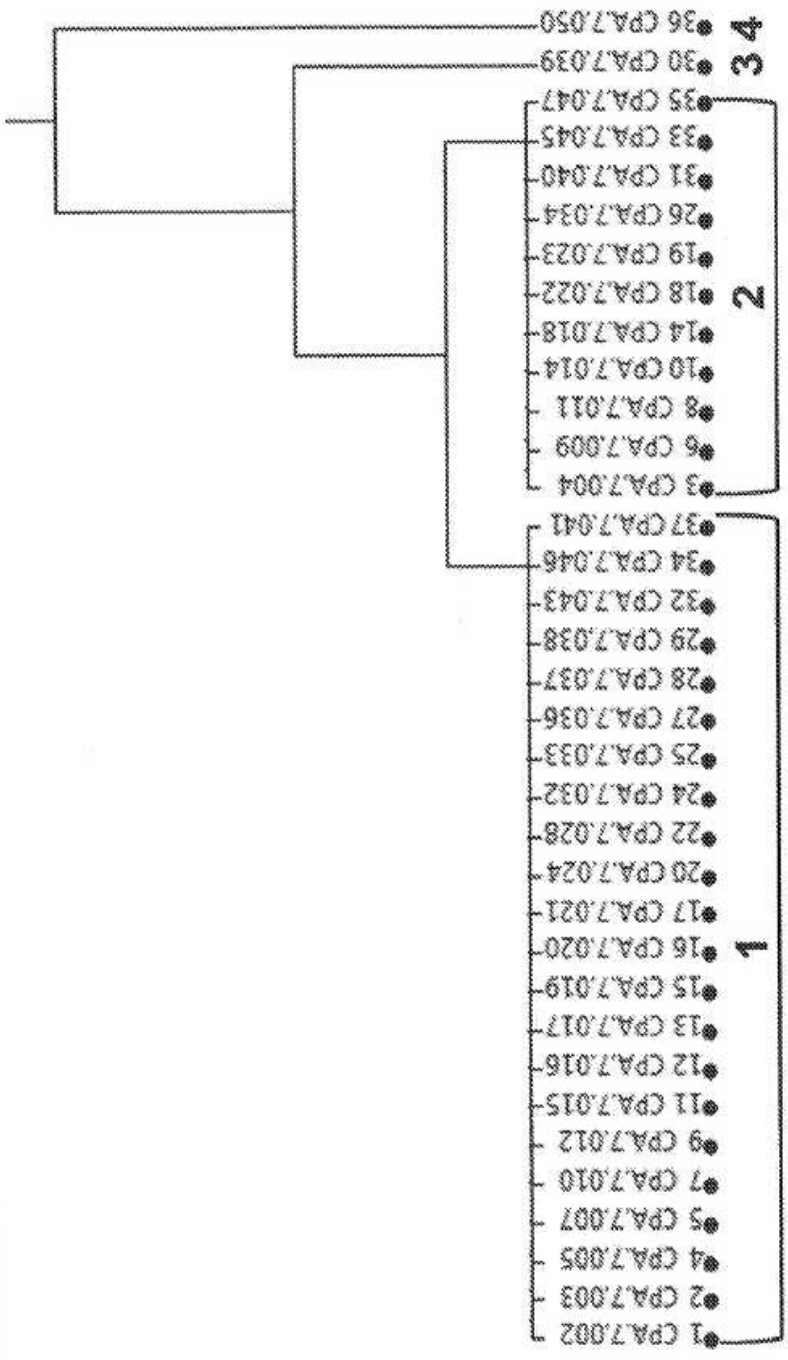
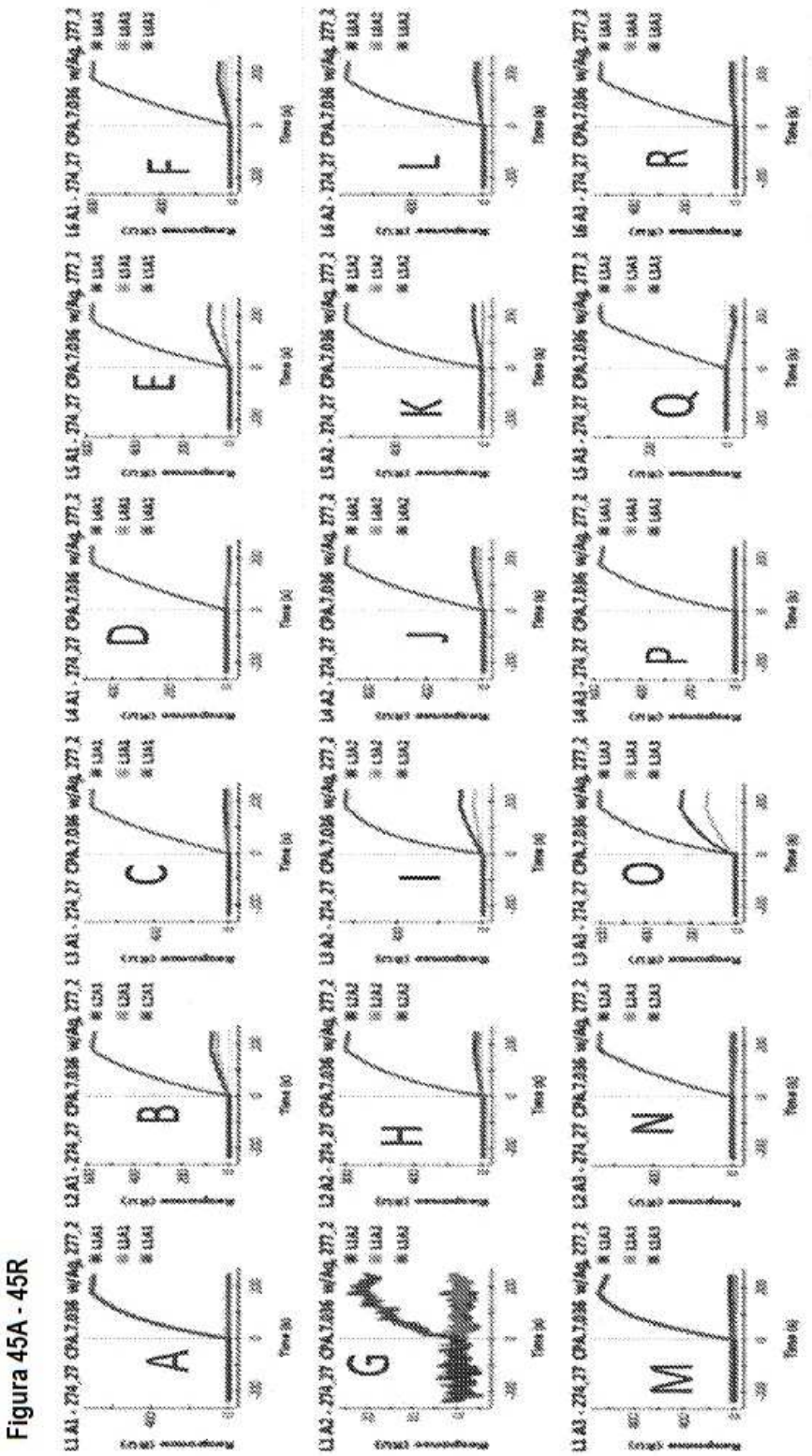
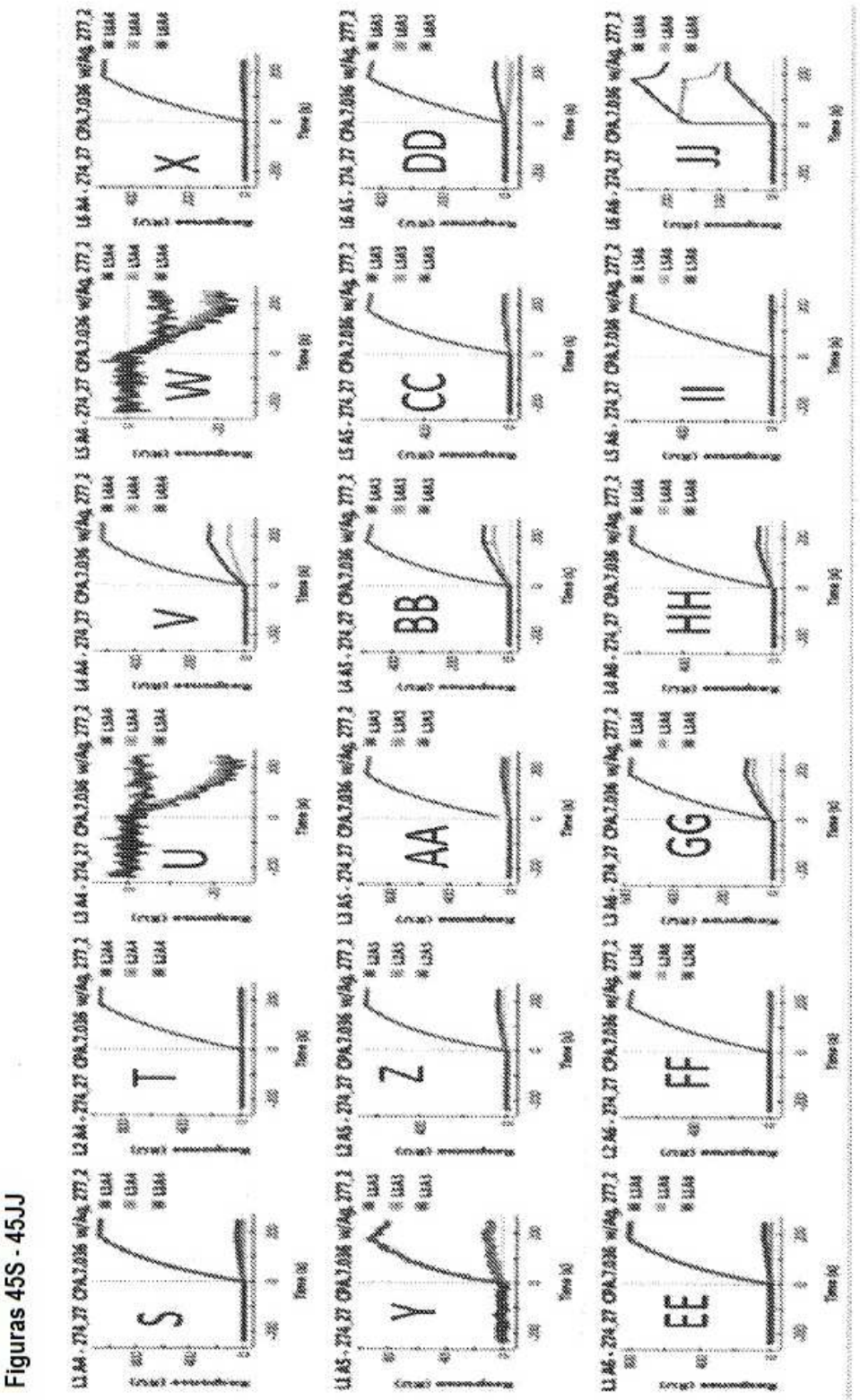

36 CPA.7.050
30 CPA.7.039
35 CPA.7.047
33 CPA.7.045
31 CPA.7.040
26 CPA.7.034
19 CPA.7.023
18 CPA.7.022
14 CPA.7.018
10 CPA.7.014
8 CPA.7.011
6 CPA.7.009
3 CPA.7.004
37 CPA.7.041
34 CPA.7.046
32 CPA.7.043
29 CPA.7.038
28 CPA.7.037
27 CPA.7.036
25 CPA.7.033
24 CPA.7.032
22 CPA.7.028
20 CPA.7.024
17 CPA.7.021
16 CPA.7.020
15 CPA.7.019
13 CPA.7.017
12 CPA.7.016
11 CPA.7.015
9 CPA.7.012
7 CPA.7.010
5 CPA.7.007
4 CPA.7.005
2 CPA.7.003
1 CPA.7.002
3 4
2
1

Figura 44

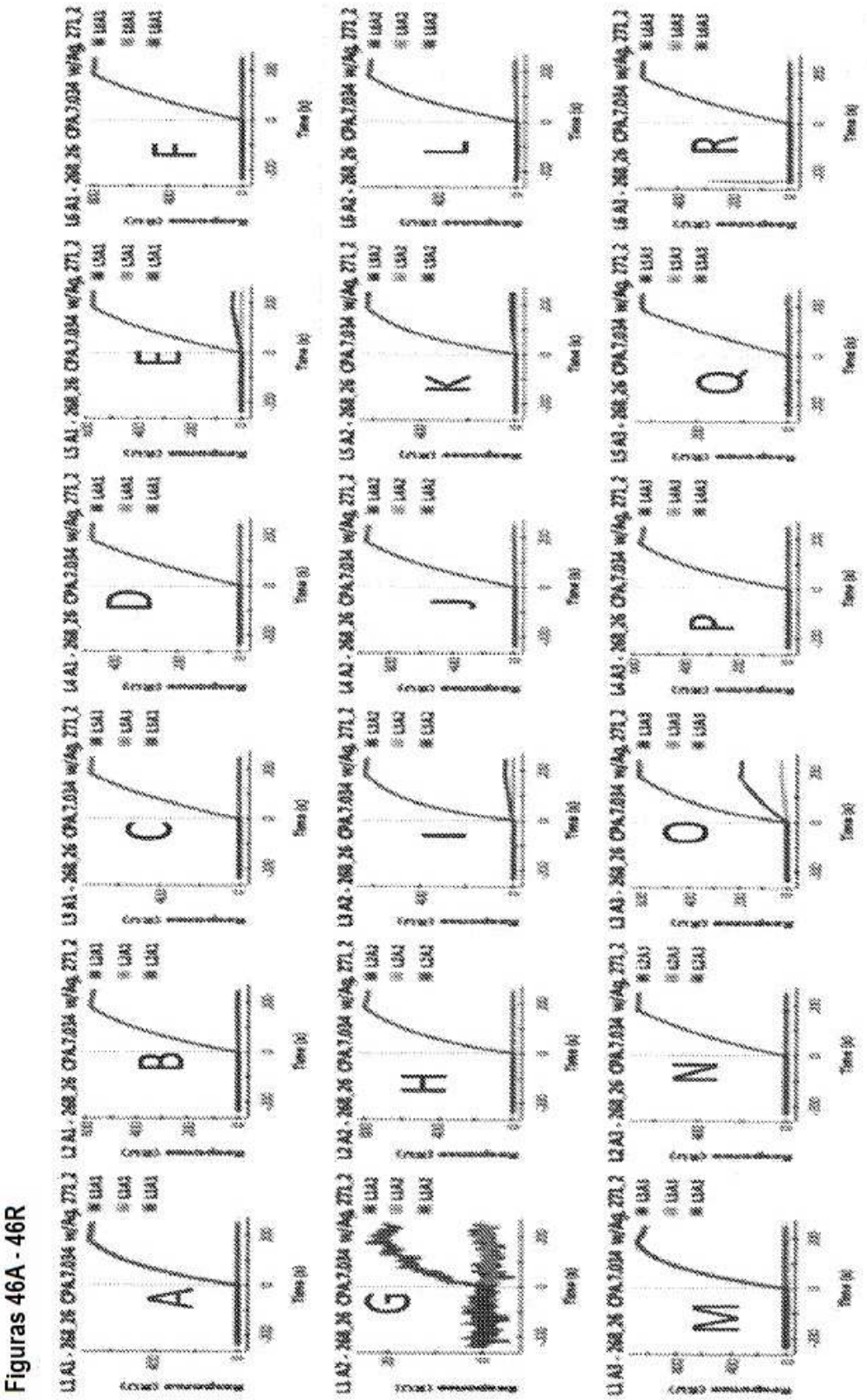
Figura 45A - 45R



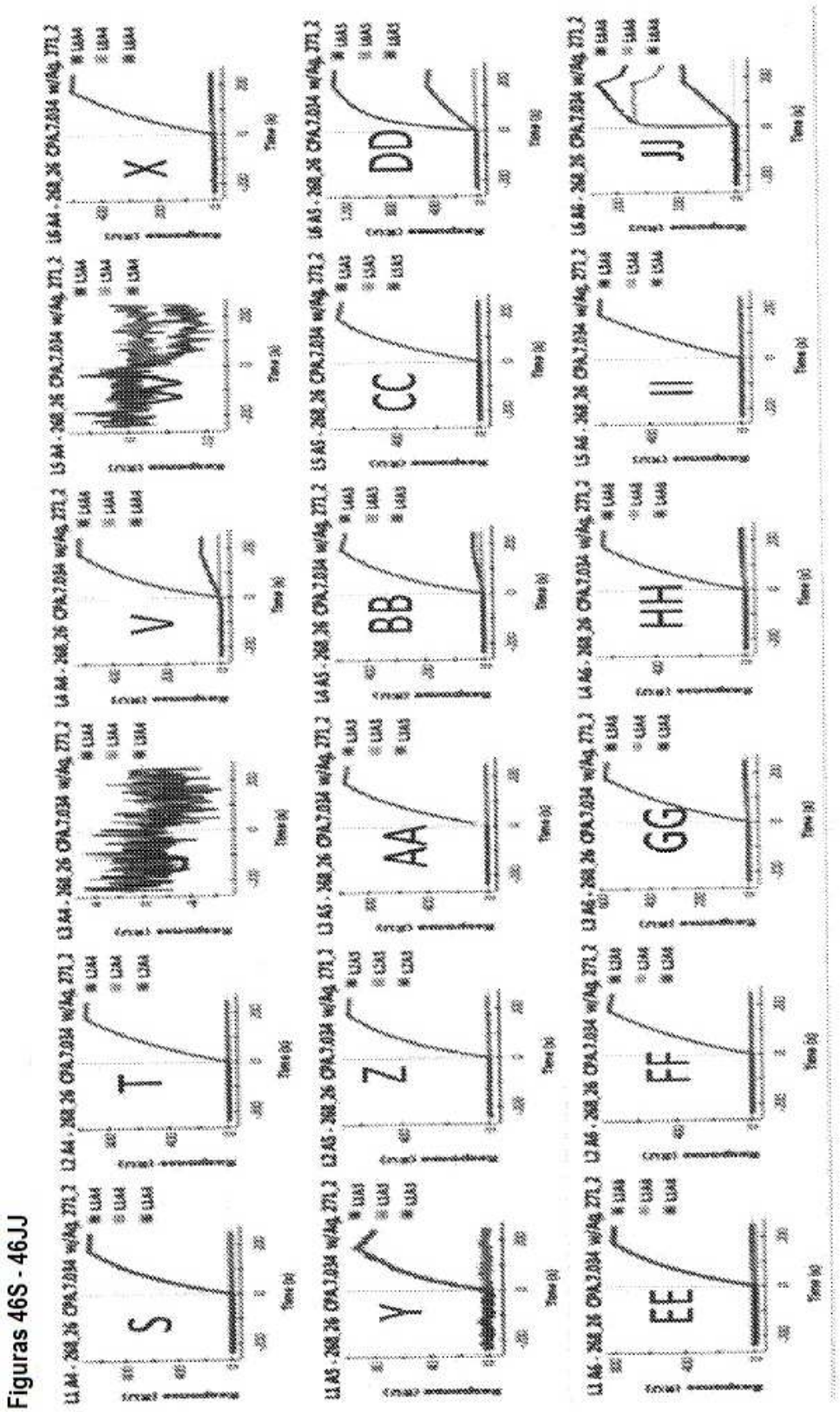
Figuras 45S - 45JJ



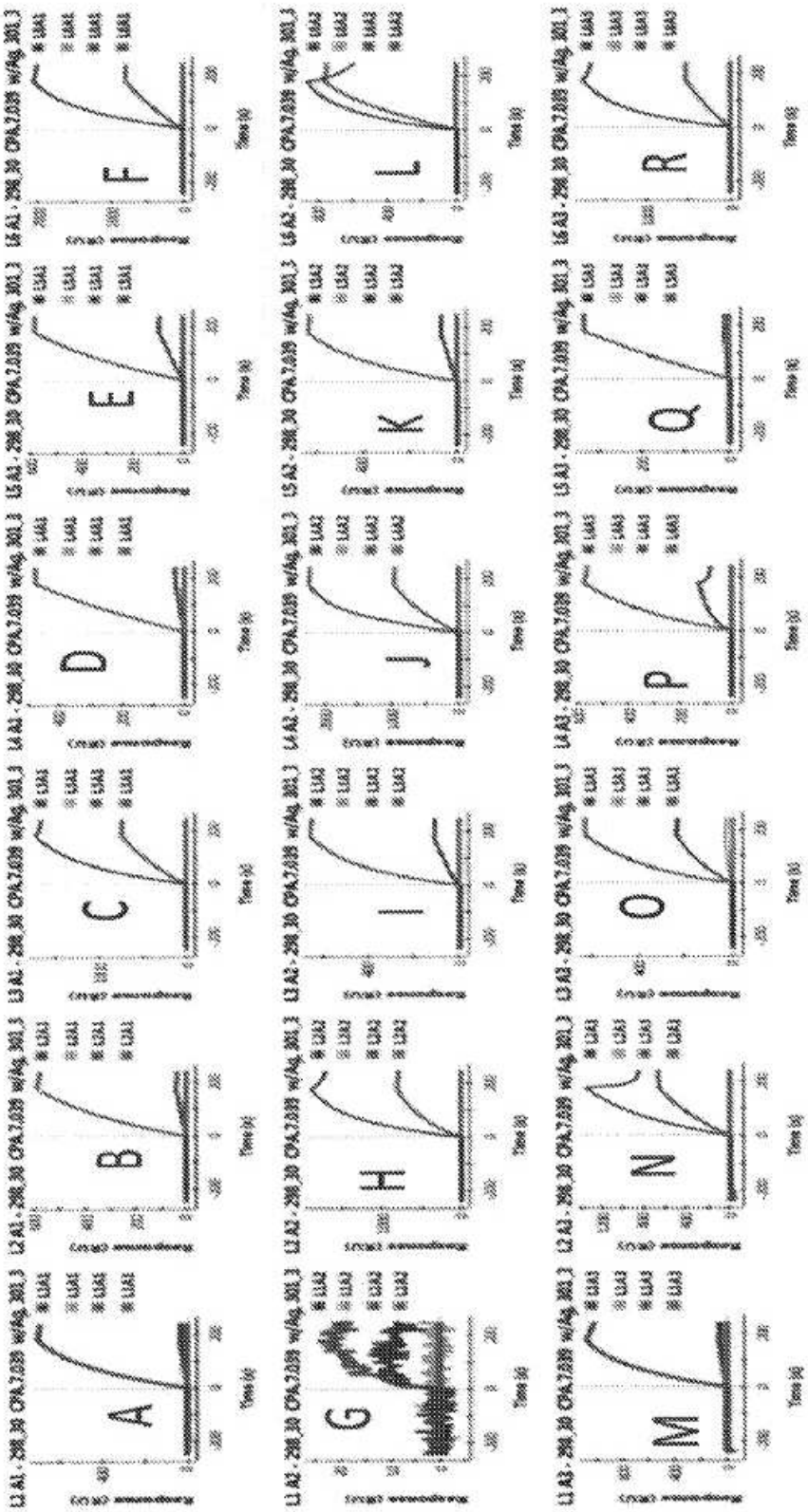
Figuras 46A - 46R



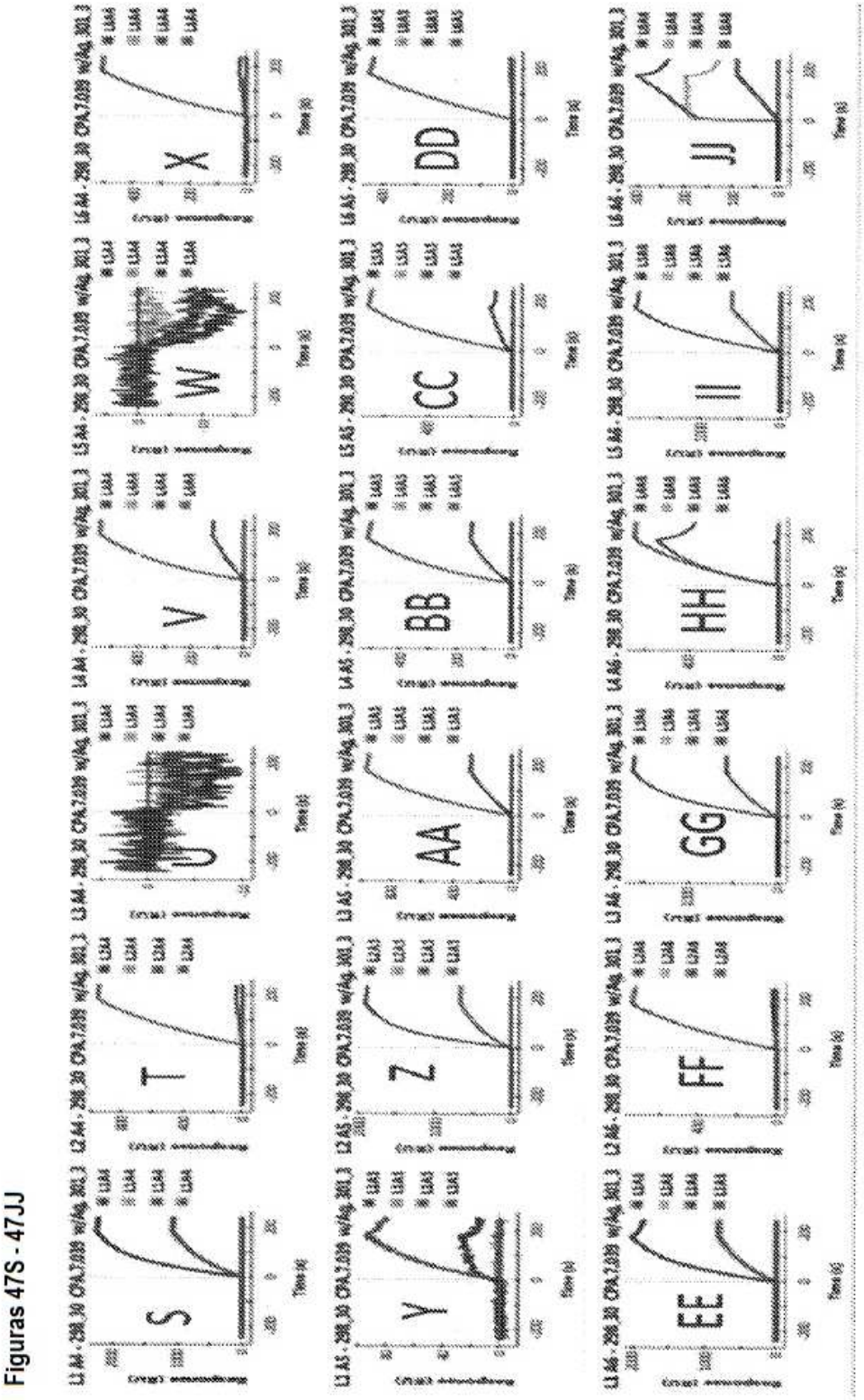
Figuras 46S - 46JJ



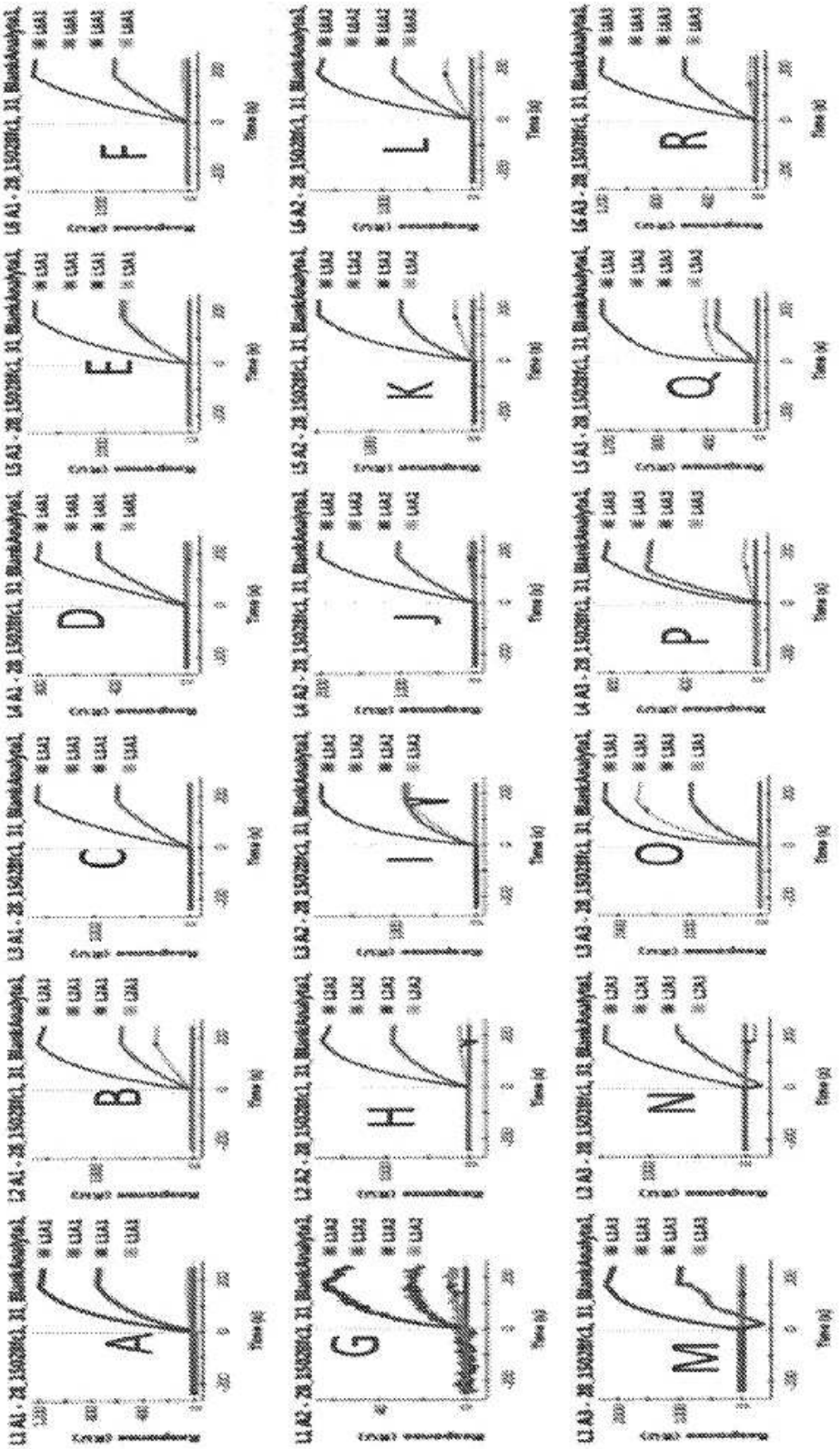
Figuras 47A - 47R



Figuras 47S - 47JJ



Figuras 48A - 48R



Figuras 48S - 48JJ

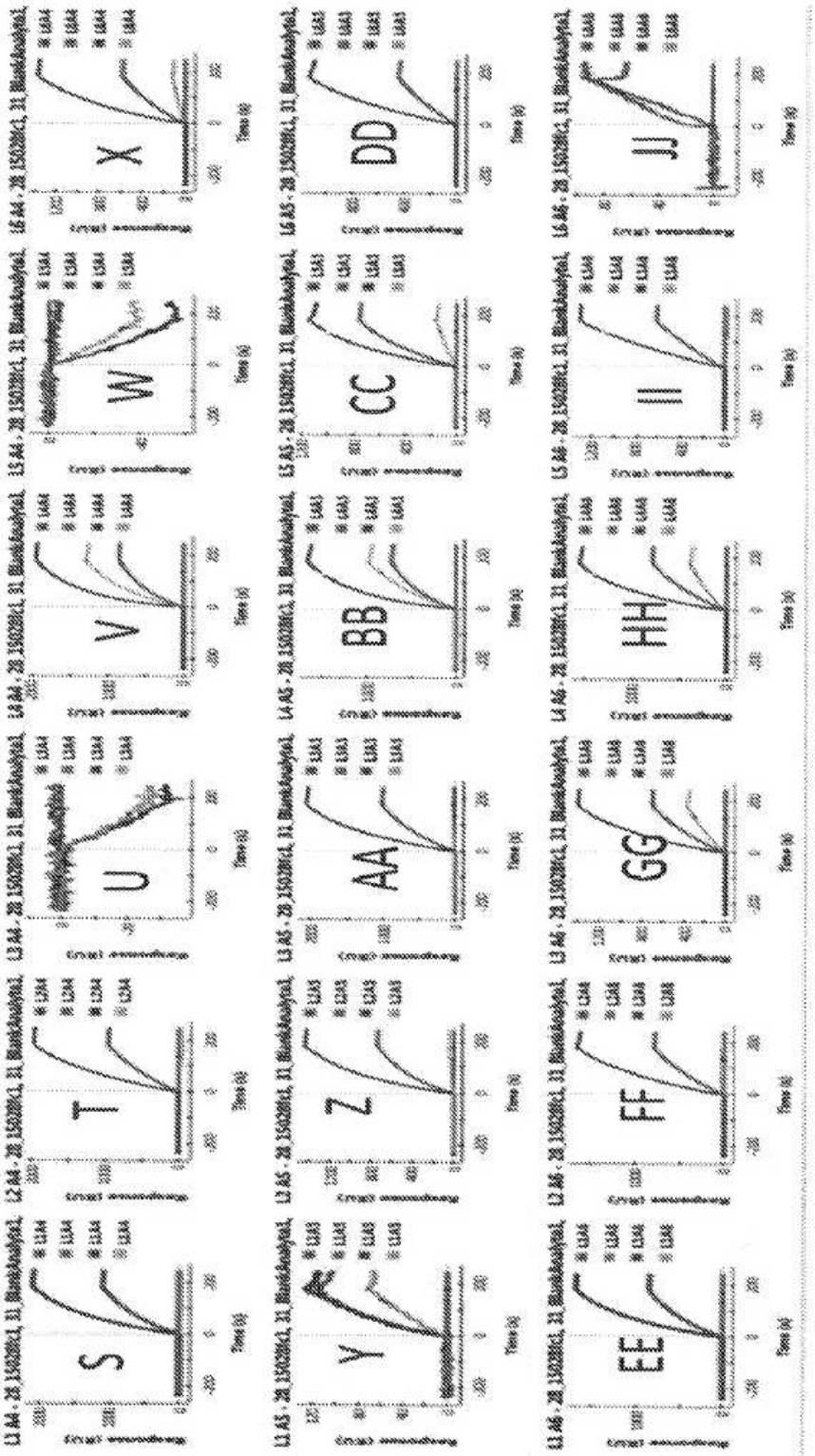


Figura 49

Tabla 1		k_a	k_d	K_D
Clon Fab	Figura	1/M-s	1/s	M
CPA.7.021	1A	2.20E+05	2.90E-05	1.32E-10
CPA.7.028	1B	3.08E+06	4.33E-04	1.41E-10
CPA.7.019	1C	8.59E+05	1.87E-04	2.18E-10
CPA.7.012	1D	1.51E+06	9.54E-04	6.32E-10
CPA.7.007	1E	3.24E+05	4.55E-04	1.41E-09
CPA.7.015	1F	3.13E+05	1.11E-03	3.55E-09
CPA.7.050	1G	7.08E+04	4.00E-04	5.65E-09
CPA.7.048	1H	1.35E+05	2.57E-03	1.90E-08
CPA.7.049	1I	1.51E+05	3.67E-03	2.44E-08
CPA.7.040	1J	1.33E+05	3.69E-03	2.77E-08
CPA.7.020	1K	1.34E+05	3.86E-03	2.88E-08
CPA.7.002	1L	4.59E+04	2.83E-03	6.16E-08
CPA.7.022	1M	3.55E+06	2.96E-01	8.33E-08
CPA.7.005	1N	5.22E+04	4.39E-03	8.41E-08
CPA.7.004	1O	2.12E+06	4.00E-01	1.89E-07
CPA.7.010	1P	9.06E+04	1.72E-02	1.89E-07
CPA.7.008	1Q	2.46E+04	2.03E-02	8.23E-07

Figura 50A-50Q

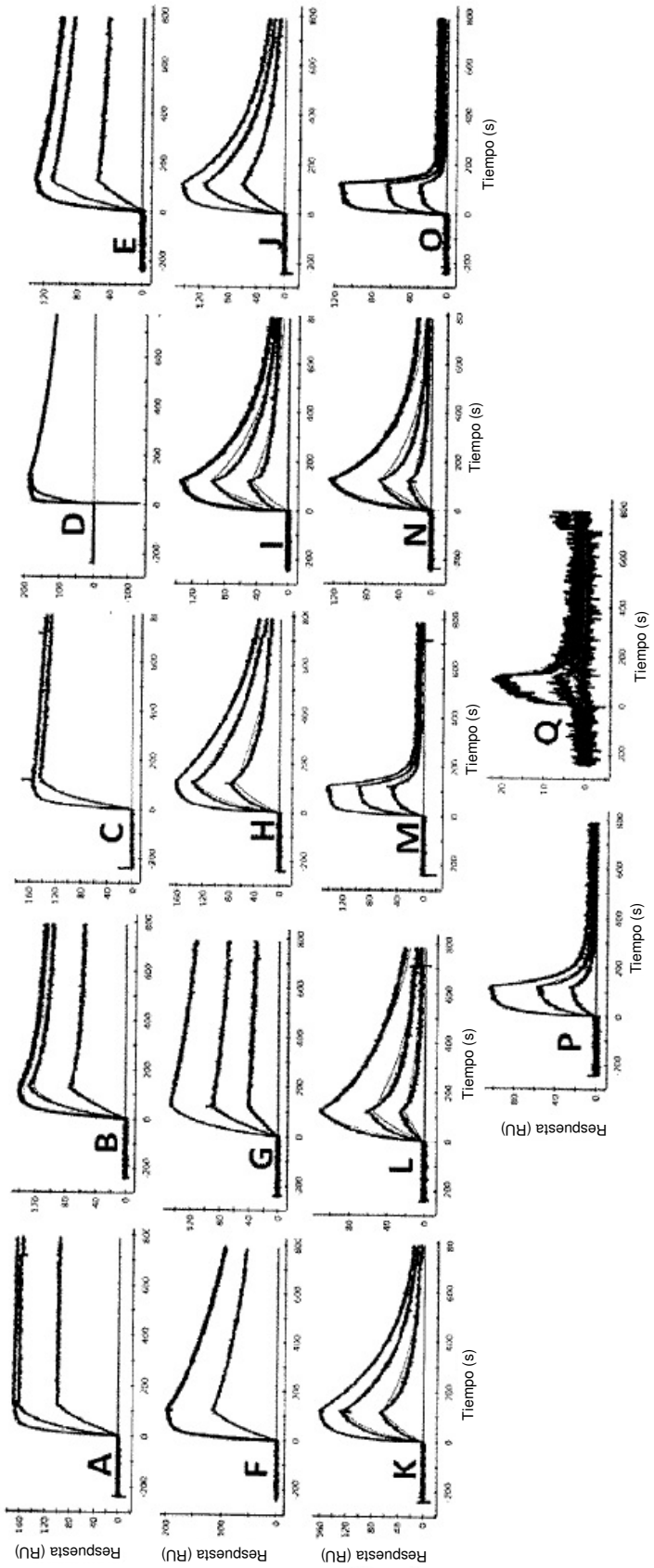


FIGURA 51A

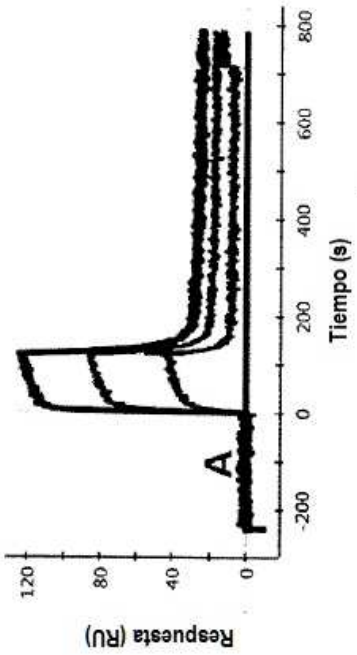


FIGURA 51B

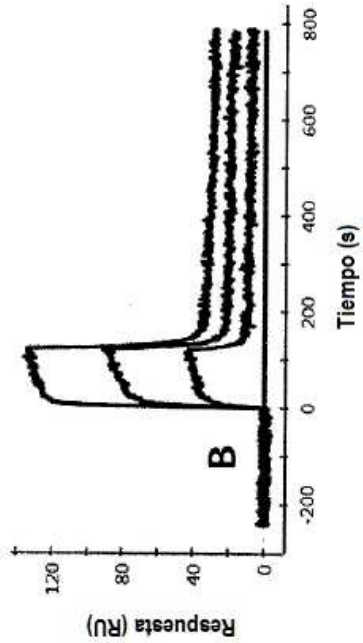


FIGURA 51C

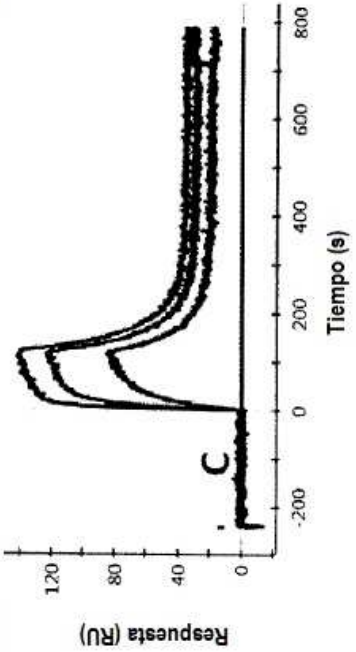


Figura 52A

Anticuerpo	Señal ELISA	% Bloqueo	>80% bloqueo
No mab control	1.376	0	NO
CPA.7.001	0.099	93	SI
CPA.7.002	0.558	59	NO
CPA.7.003	0.153	89	SI
CPA.7.004	0.166	88	SI
CPA.7.005	1.551	-13	NO
CPA.7.006	0.134	90	SI
CPA.7.007	0.529	62	NO
CPA.7.008	0.281	80	SI
CPA.7.009	0.05	96	SI
CPA.7.010	0.141	90	SI
CPA.7.011	0.067	95	SI
CPA.7.012	0.045	97	SI
CPA.7.013	0.045	97	SI
CPA.7.014	0.044	97	SI
CPA.7.015	0.142	90	SI
CPA.7.016	1.553	-13	NO
CPA.7.017	0.197	86	SI
CPA.7.018	0.156	89	SI
CPA.7.019	0.146	89	SI
CPA.7.020	0.728	47	NO
CPA.7.021	0.122	91	SI
CPA.7.022	0.081	94	SI
CPA.7.023	0.047	97	SI
CPA.7.024	0.048	97	SI
CPA.7.025	1.159	16	NO
CPA.7.026	1.12	19	NO
CPA.7.027	1.181	14	NO
CPA.7.028	0.702	49	NO
CPA.7.029	1.272	8	NO
CPA.7.030	1.176	15	NO
CPA.7.031	0.673	51	NO
CPA.7.032	0.427	69	NO
CPA.7.033	0.186	86	SI

Figura 52B

Anticuerpo	Señal ELISA	% Bloqueo	>80% bloqueo
CPA.7.034	0.26	81	SI
CPA.7.035	1.16	16	NO
CPA.7.036	0.184	87	SI
CPA.7.037	0.915	34	NO
CPA.7.038	0.301	78	NO
CPA.7.039	0.541	61	NO
CPA.7.040	0.048	97	SI
CPA.7.041	0.356	74	NO
CPA.7.042	0.307	78	NO
CPA.7.043	0.773	44	NO
CPA.7.044	1.025	26	NO
CPA.7.045	0.93	32	NO
CPA.7.046	0.104	92	SI
CPA.7.047	0.223	84	SI
CPA.7.049	0.077	94	SI
CPA.7.050	0.174	87	SI

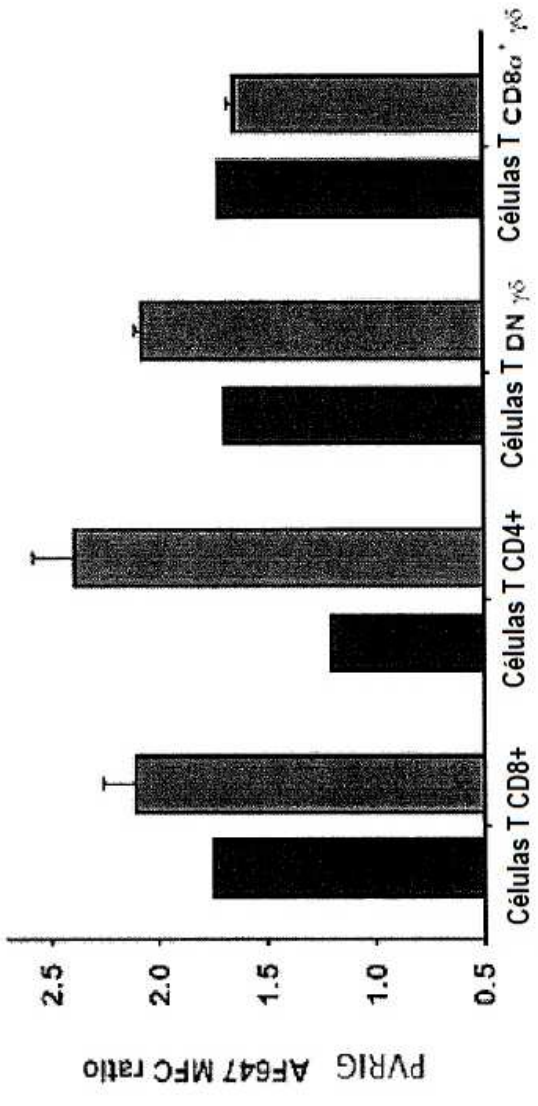

Pre-activación
Post-activación
pVRIG AF647 MFC ratio
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
Células T CD8+
Células T CD4+
Células T DN γδ
Células T CD8α+ γδ

Figura 53

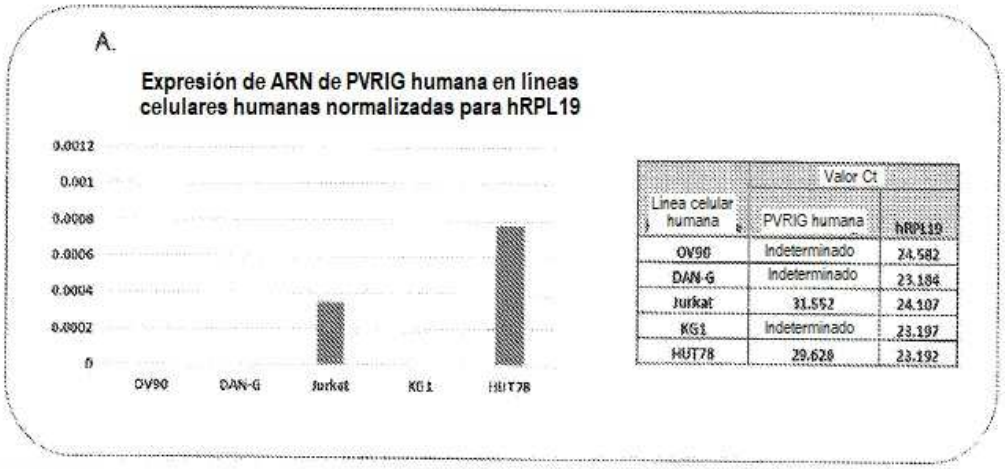
Figura 54

Línea celular	ATCC nº/CLS /ECACC nº	Morfología	Fuente
HL-60	ATCC, CCL-240	Leucemia	Sangre
THP1	ATCC, TIB-202	Monocito	Sangre
KG-1	ATCC, CCL-246	Macrófago	Médula ósea
Jurkat	ATCC, TIB-152	Célula T	Sangre
RPMI8226	ATCC, CCL-155	Linfocito B	Sangre
DAN-G	CLS, 300162	Epitelial	Páncreas
OV90	ATCC, CRL-11732	Epitelial	Ovario
NCI-H441	ATCC, CRL-174	Epitelial	Pulmón
TF1	ATCC, CRL-2003	Eritroblasto	Médula ósea
Capan2	ATCC, HTB-80	poligonal	Páncreas
ZR75-1	ATCC, CRL-1500	Epitelial	Glándula mamaria
Karpas299	ECACC, 06072604-1VL	Linfoma	Sangre
NK-YTS	ATCC, CL-273	Linfoblasto	Sangre
H9	ATCC, HTB-176	Linfoblasto	Sangre
K562	ATCC, CCL-243	Linfoblasto	Médula ósea
NCI-H929	ATCC, CRL-9068	Linfoblasto	Linfocitos B
BCP1	ATCC, CRL-2294	Linfoblasto	Linfoblastos B
HUT78	ATCC, TIB-161	Linfoblasto	Sangre
HEK293	ATCC, CRL-3216	Epitelial	Riñón

Figura 55

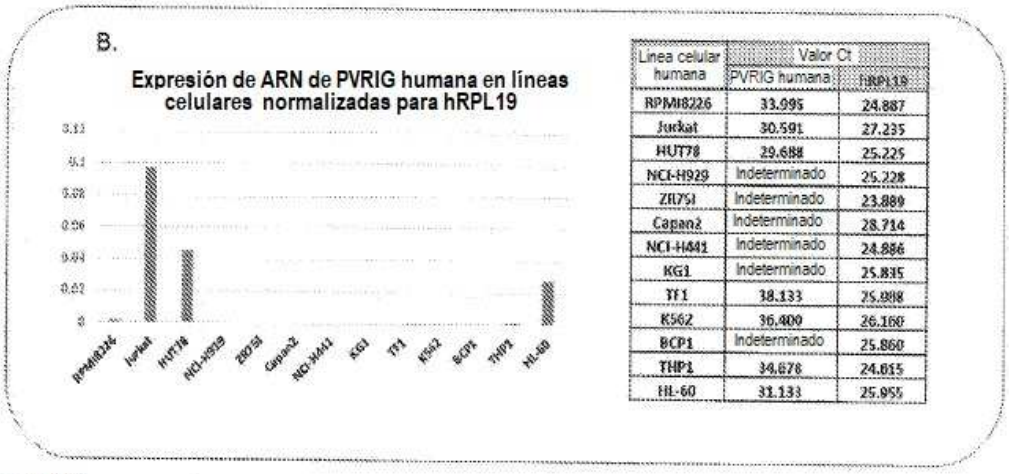
Linea celular	ATCC nº	Morfología	Fuente
4T1	CRL-2539	Epitelial	Glándula mamaria
B16-F1	CRL-6323	Células forma husillo+tipo epitelial	Piel
EL4	TIB-39	Linfoblastos T	Sangre
E.G7-OVA	CRL-2113	Linfoblastos T	Sangre
YAC-1	TIB-160	Linfoblastos T	Sangre
A20	TIB-208	Linfoblastos B	Sangre
P815	TIB-64	Mastocitos	Sangre
NIH/3T3	CRL-1658	Fibroblastos	Embrión
Sal/N	CRL-2544	Fibroblastos	Fibrosarcoma
J774A.1	TIB-67	Macrófago	Sangre
LL/2	CRL-1642	Epitelial	Pulmón
B104-1-1	CRL-1887	Fibroblastos	Glioblastoma
RAW264.7	TIB-71	Macrótago	Tumor inducido virus leucemia ratón Abelson
P388D1	CCL-46	Macrótago	Linfoblasto
KLN205	CRL-1453	Epitelial	Pulmón
CT26	CRL-2638	Fibroblastos	Colon
Renca	CRL-2947	Epitelial	Riñón

Figura 56A



Línea celular humana	Valor Ct	
	PVRIG humana	hRPL19
OV90	Indeterminado	24.582
DAN-G	Indeterminado	23.184
Jurkat	31.552	24.107
KG1	Indeterminado	23.197
HUT78	29.628	23.192

Figura 56B



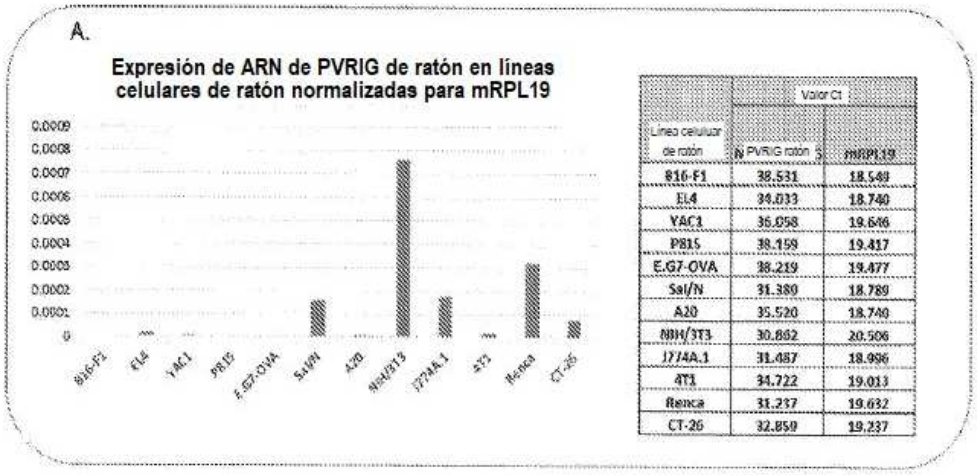
Línea celular humana	Valor Ct	
	PVRIG humana	hRPL19
RPMI8226	33.995	24.887
Jurkat	30.591	27.235
HUT78	29.688	25.225
NCI-H929	Indeterminado	25.228
ZR75I	Indeterminado	23.889
Capan2	Indeterminado	28.714
NCI-H441	Indeterminado	24.886
KG1	Indeterminado	25.835
TF1	38.133	25.888
K562	36.400	26.160
BCP1	Indeterminado	25.860
THP1	34.678	24.615
HL-60	31.133	25.955

Figura 56C

C.

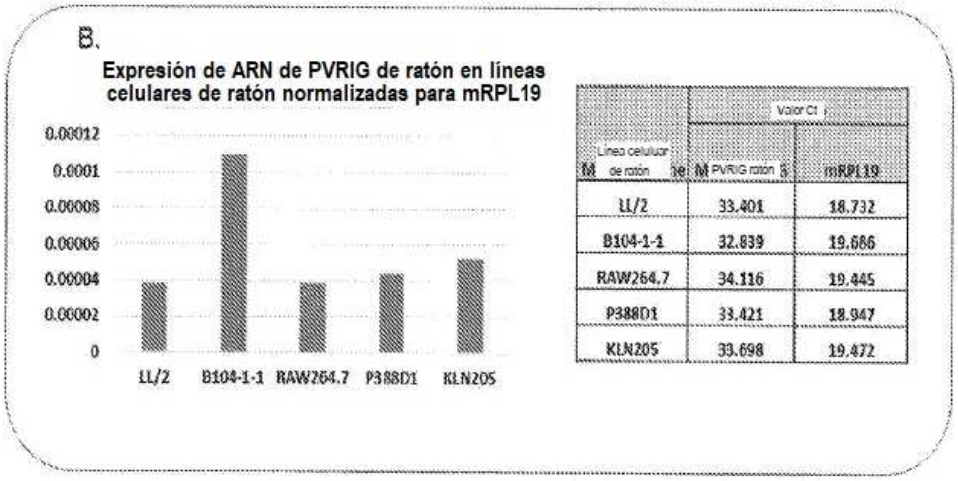
Línea celular humana	Valor Ct					
	PVRIG humana	hTATA box	hRPL19	hPBGD	hSDHA	hHPRT1
DAN-G	39.92	30.14	27.4	27.4	26.59	27.99
NCI-H441	38.46	28.34	26.71	26.71	26.2	27.36
KG1	38.95	28.39	26.74	28.28	26.39	26.39
TF1	39.22	29.25	27.61	33.74	36.25	36.25

Figura 57A



Línea celular de ratón	Valor Ct	
	N PVRIG ratón S	mRPL19
B16-F1	38.531	18.549
EL4	39.033	18.740
YAC1	36.058	19.646
P815	38.159	19.417
E.G7-OVA	38.219	19.477
Sal/N	31.380	18.789
A20	35.520	18.740
NIH/3T3	30.882	20.506
J774A.1	31.487	18.996
4T1	34.722	19.013
Renca	31.237	19.632
CT-26	32.859	19.237

Figura 57B



Línea celular de ratón	Valor Ct	
	M PVRIG ratón S	mRPL19
LL/2	33.401	18.732
B104-1-1	32.839	19.686
RAW264.7	34.116	19.445
P388D1	33.421	18.947
KLN205	33.698	19.472

Figura 58

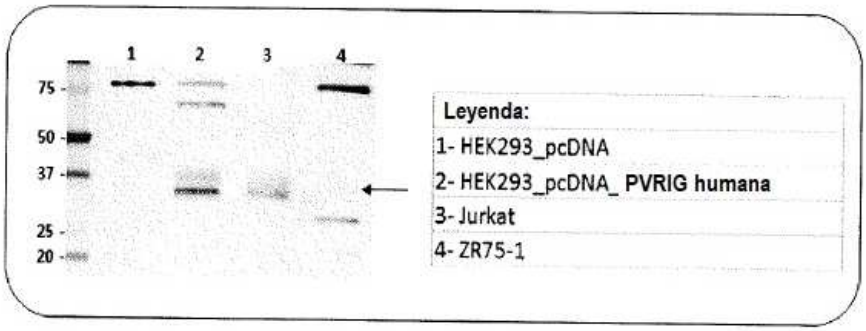
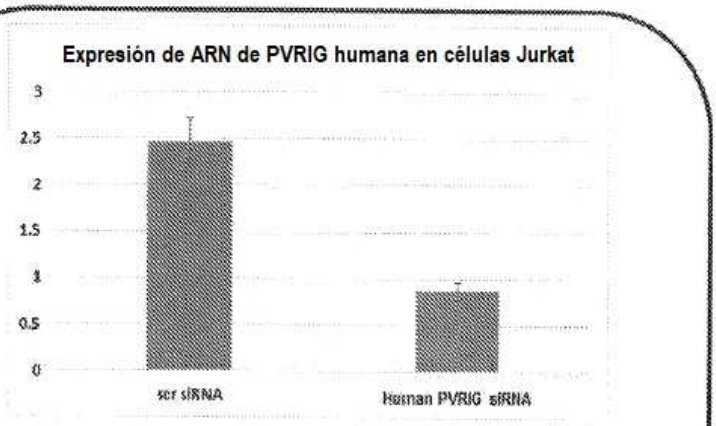

1
2
3
4
75
50
37
25
20
Leyenda:
1- HEK293_pcDNA
2- HEK293_pcDNA_ PVRIG humana
3- Jurkat
4- ZR75-1

Figura 59



Nombre Muestra	Valor Ct		
	PVRIG humana	hHPRT1	hRPL19
Scr siRNA#1	30.622	21.608	21.924
Scr siRNA#2	30.526	21.953	21.915
Scr siRNA#3	30.820	22.227	22.156
hPVRIG siRNA#1	32.923	22.658	22.462
hPVRIG siRNA#2	32.678	22.859	22.542
hPVRIG siRNA#3	32.927	22.598	22.779

Figura 60

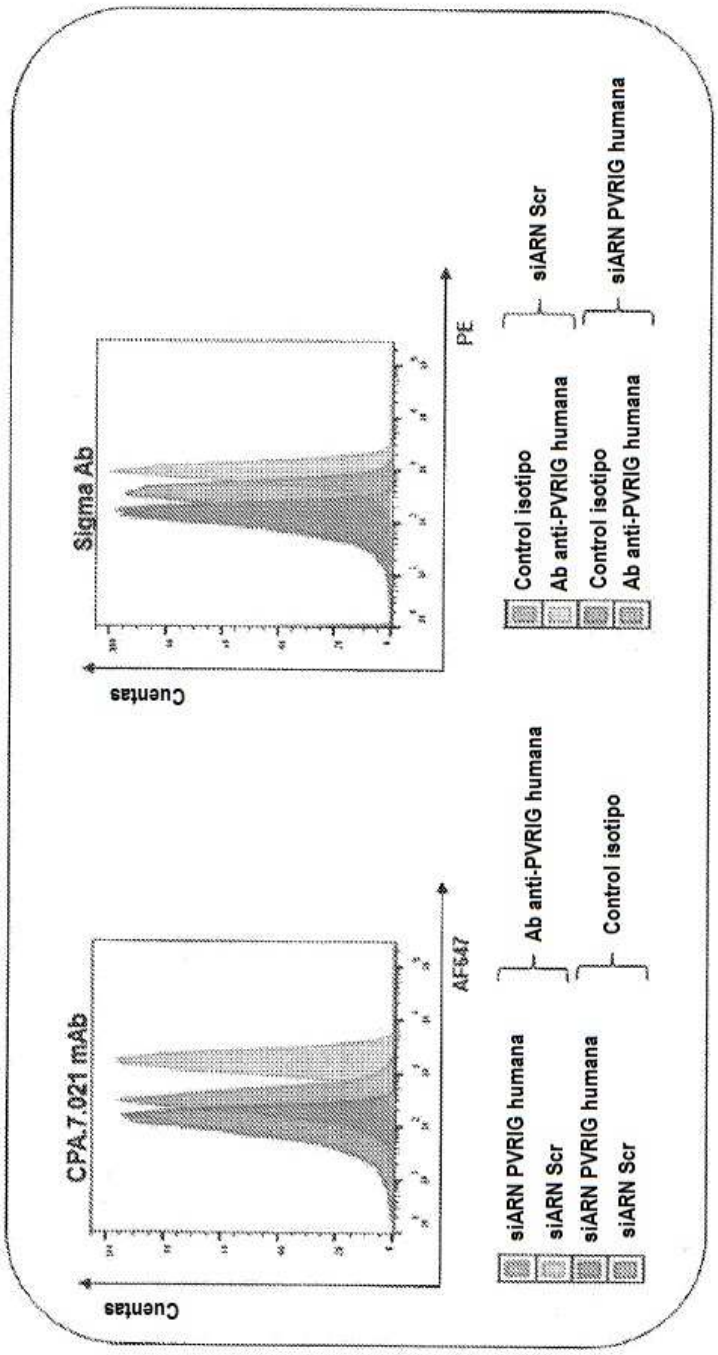

Sigma Ab
Cuentas
PE
Control isotipo
Ab anti-PVRIG humana
Control isotipo
Ab anti-PVRIG humana
siARN Scr
siARN PVRIG humana
CPA.7.021 mAb
Cuentas
AF647
siARN PVRIG humana
siARN Scr
siARN PVRIG humana
siARN Scr
Ab anti-PVRIG humana
Control isotipo

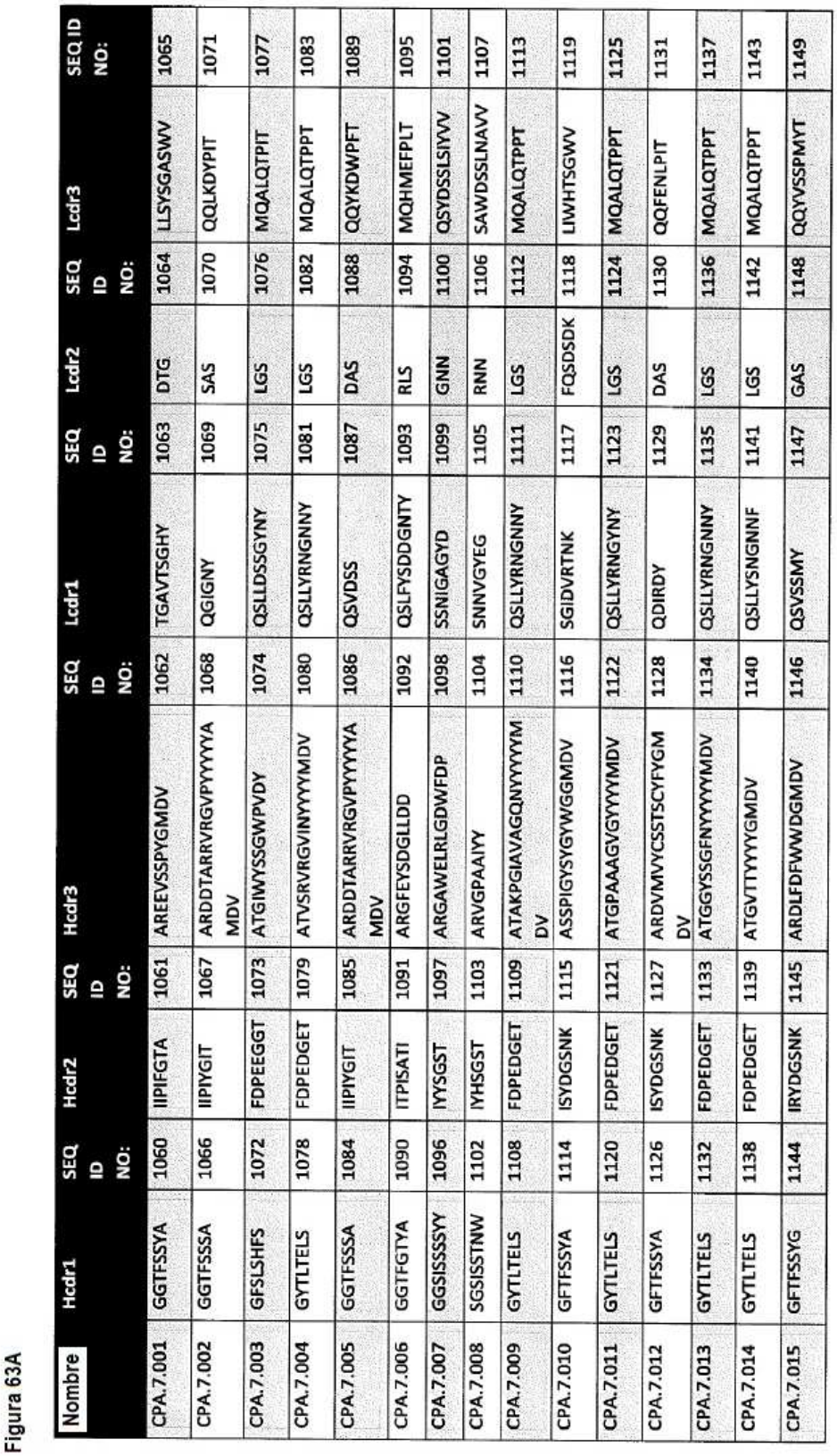
Figura 61

Linea celular	qRT-PCR	FACS	WB	%KD-RNA	%KD-FACS
	(PVRIG Ct / HSKG Ct)	(tasa cambio isotipo)			
OV90	Indeterminado/24.582	NT	NT		
DAN-G	Indeterminado/23.184	NT	NT		
Jurkat	31.552/24.107	14	+	65	82
KG1	Indeterminado/23.197	NT	NT		
HUT78	29.626/23.192	X	NT		
RPMI8226	33.995/24.887	NT	NT		
NCI-H929	Indeterminado/25.228	NT	NT		
ZR75-1	Indeterminado/23.889	X	X		
Capan2	Indeterminado/28.714	X	NT		
NCI-H441	Indeterminado/24.886	NT	NT		
TF1	38.133/25.988	NT	NT		
K562	36.400/26.160	NT	NT		
BCP1	Indeterminado/25.860	NT	NT		
THP1	34.678/24.615	NT	NT		
HL60	31.133/25.955	NT	NT		
Karpas299	NT	X	NT		
NK-YTS	NT	X	NT		

Figura 62

Línea celular	qRT-PCR (PVRIG Ct / HSKG Ct)	FACS (tasa cambio isotipo)	WB	%KD-RNA	%KD-FACS
4T1	34.722/19.013	NT	NT		
B16-F1	38.531/18.549	NT	NT		
EL4	34.033/18.740	NT	NT		
YAC-1	36.058/19.646	NT	NT		
P815	38.159/19.417	NT	NT		
E.G7-OVA	38.219/19.477	NT	NT		
NIH3T3	29.94 / 21.25	X	NT		
SAI/N	31.389/18.789	X	NT		
J774A.1	31.487/18.996	X	NT		
A20	35.520/18.740	NT	NT		
LL/2	33.401/18.732	NT	NT		
B104-1-1	32.839/19.686	NT	NT		
RAW264.7	34.116/19.445	NT	NT		
P388D1	33.421/18.947	NT	NT		
KLN205	33.698/19.472	NT	NT		
Renca	31.237/19.632	X	NT		

Figura 63A



Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.001	GGTFSSYA	1060	IIPIFGTA	1061	AREEVSSPYGMDV	1062	TGAVTSGHY	1063	DTG	1064	LLSYSGASWV	1065
CPA.7.002	GGTFSSSA	1066	IIPIYGIT	1067	ARDDTARRVRGVPYYYYYA MDV	1068	QGIGNY	1069	SAS	1070	QQLKDYPIT	1071
CPA.7.003	GFSLSHFS	1072	FDPEEGGT	1073	ATGIWYSSGWPVDY	1074	QSLLDSSGYNY	1075	LGS	1076	MQALQTPIT	1077
CPA.7.004	GYTLTELS	1078	FDPEDGET	1079	ATVSRVRGVINYYYYMDV	1080	QSLLYRNGNNY	1081	LGS	1082	MQALQTPPT	1083
CPA.7.005	GGTFSSSA	1084	IIPIYGIT	1085	ARDDTARRVRGVPYYYYYA MDV	1086	QSVDSS	1087	DAS	1088	QQYKDWPFT	1089
CPA.7.006	GGTFGTYA	1090	ITPISATI	1091	ARGFEYSDGLLDD	1092	QSLFYSDDGNTY	1093	RLS	1094	MQHMEFPLT	1095
CPA.7.007	GGSISSSSYY	1096	IYYSGST	1097	ARGAWELRLGDWFDP	1098	SSNIGAGYD	1099	GNN	1100	QSYDSSLSIYVV	1101
CPA.7.008	SGSISSTNW	1102	IYHSGST	1103	ARVGPAAIYY	1104	SNNVGYEG	1105	RNN	1106	SAWDSSLNAVV	1107
CPA.7.009	GYTLTELS	1108	FDPEDGET	1109	ATAKPGIAVAGQNYYYYYM DV	1110	QSLLYRNGNNY	1111	LGS	1112	MQALQTPPT	1113
CPA.7.010	GFTFSSYA	1114	ISYDGSNK	1115	ASSPIGYSYGYWGGMDV	1116	SGIDVRTNK	1117	FQSDSDK	1118	LIWHTSGWV	1119
CPA.7.011	GYTLTELS	1120	FDPEDGET	1121	ATGPAAAGVGYYYYMDV	1122	QSLLYRNGYNY	1123	LGS	1124	MQALQTPPT	1125
CPA.7.012	GFTFSSYA	1126	ISYDGSNK	1127	ARDVMVYCSSTSCYFYGM DV	1128	QDIRDY	1129	DAS	1130	QQFENLPIT	1131
CPA.7.013	GYTLTELS	1132	FDPEDGET	1133	ATGGYSSGFNYYYYYMDV	1134	QSLLYRNGNNY	1135	LGS	1136	MQALQTPPT	1137
CPA.7.014	GYTLTELS	1138	FDPEDGET	1139	ATGVTYYYYGMDV	1140	QSLLYSNGNNF	1141	LGS	1142	MQALQTPPT	1143
CPA.7.015	GFTFSSYG	1144	IRYDGSNK	1145	ARDLFDFWWDGMDV	1146	QSVSSMY	1147	GAS	1148	QQYVSSPMYT	1149

Figura 63B

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.016	GGTFSSSA	1150	IIPIYGIT	1151	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1152	QSVSSY	1153	DAS	1154	QQYDDWPQT	1155
CPA.7.017	GGTFNNYG	1156	IIPLFGTT	1157	ARDRMAADGMAVFDY	1158	SSNIGRHF	1159	KND	1160	SSWDAALNGVV	1161
CPA.7.018	GYTLTELS	1162	FDPEDGET	1163	ATEVPMVRGARRYYYYMDV	1164	QTLLYINENNY	1165	LGS	1166	MQGLQTPPT	1167
CPA.7.019	GGSISNSNYY	1168	IYYSGST	1169	ARGAWELSLGDWFDP	1170	SSNIGAGYD	1171	GNN	1172	QSYDSSLSVYVV	1173
CPA.7.020	GGTFSSSA	1174	IIPIYGIT	1175	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1176	QNVYGE	1177	DTF	1178	QQRRDWPIT	1179
CPA.7.021	GFTFGTSS	1180	ISFDGTEI	1181	AKGSGNIYFYSGMDV	1182	QSISGW	1183	ETS	1184	QQYYSYPLT	1185
CPA.7.022	GYTLTELS	1186	FDPEDGET	1187	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	1188	QSLLYSNGYNY	1189	LGS	1190	MQALQSPVT	1191
CPA.7.023	GYTLTELS	1192	FDPEDGET	1193	ATDSRDGPAARGGYYYYMDV	1194	QSLLYINGYNY	1195	LGS	1196	MQALQTPPT	1197
CPA.7.024	GGTFSSYA	1198	IIPIFGTA	1199	ARDAYYYDSSGYYNPDAFDI	1200	QSLLHSNGYNY	1201	LGS	1202	MQGLQTPRT	1203
CPA.7.025	GFSLTSGGMS	1204	IDWNDDK	1205	ARIRGMTWGFDS	1206	QSVSSSY	1207	GAS	1208	QQYGTTPFA	1209
CPA.7.026	GYTFTAYY	1210	INPNSGGT	1211	ARDGAFYYGSENYYNAGWFDP	1212	QSLLSGNGYNY	1213	LGS	1214	MQALKSPLT	1215
CPA.7.027	GYTFTNYY	1216	INPSGGIT	1217	ARAGLGYNWNYAPSGMDV	1218	SSDVGGYNY	1219	EVS	1220	SSYAGSNNLV	1221
CPA.7.028	GGSISSSSYY	1222	IYYSGST	1223	ARGAWELRLGDWFDP	1224	SSNIGAGYD	1225	GYS	1226	QSYDSSLSVYVV	1227
CPA.7.029	GFTFDDYA	1228	ISWNSGSI	1229	AKDVNRILVAGMVDY	1230	QSLLHSNGYNY	1231	LGS	1232	MQGLQTPIT	1233
CPA.7.030	RFTFEDYA	1234	ISWKSGGI	1235	VKDPTLVATDRAFNI	1236	QSLLHSNGYNY	1237	LGS	1238	MQYLQTPDT	1239

ES 2 806 800 T3

Figura 63C

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.031	GGTFSSSA	1240	IIPIYGIT	1241	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1242	QSLLDSDDGNIH	1243	TLS	1244	MQRKEFPLT	1245
CPA.7.032	GFTFSSYG	1246	ISYDGSNK	1247	AKEDRLRFLEWLFYGMDV	1248	HDIYTY	1249	DAS	1250	QQYDNHPPEVT	1251
CPA.7.033	GGTFSSSA	1252	IIPIYGIT	1253	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1254	QDIDDD	1255	EAS	1256	LQHDNLPLT	1257
CPA.7.034	GYTLTELS	1258	FDPEDGET	1259	ATEDPGPVAGPYYYYGMDV	1260	QSLLYINGYHY	1261	LGS	1262	MQALQTPPT	1263
CPA.7.035	GYMFTNYP	1264	INAGTGNT	1265	AREGMFYYGLESYYKGGWFDP	1266	QSLLHRNGYNY	1267	LAS	1268	MQALQTPLT	1269
CPA.7.036	GGTFSSSA	1270	IIPIYGIT	1271	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1272	QSLLDSDDGNTY	1273	TLS	1274	MQRLQFPLT	1275
CPA.7.037	TYTFTTYY	1276	IYPSGGNT	1277	VRDQNYYYSAMDV	1278	QDIRNY	1279	DAS	1280	QQFENLPIT	1281
CPA.7.038	GGTFSSSA	1282	IIPIYGIT	1283	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1284	RDISDS	1285	DAS	1286	HQYDNLPLT	1287
CPA.7.039	GFNFRGYA	1288	ISGSGGTT	1289	AQSYAQIGYGGHIDH	1290	SGIDVATYM	1291	YKSDSDK	1292	LIWHGSHYV	1293
CPA.7.040	GYTLTELS	1294	FDPEDGET	1295	ATGVPAAIGVYYYYYYMDV	1296	QSLLYRNGYNY	1297	WGS	1298	MQAVQNPPT	1299
CPA.7.041	GGTFSSSA	1300	IIPIYGIT	1301	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1302	QNIDSS	1303	YAS	1304	HQSSSLPLT	1305
CPA.7.042	GGTFSSSA	1306	IIPIYGIT	1307	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1308	QSVYNNY	1309	DAS	1310	QQYNSWPPYT	1311
CPA.7.043	GGTFSSYA	1312	IIPIFGTA	1313	ARDAYYYDSSGYYNPDAFDI	1314	QSLLYSNGYNY	1315	LGS	1316	MQARQTPYT	1317
CPA.7.044	GGTFSSSA	1318	IIPIYGIT	1319	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1320	ESVTTF	1321	DAS	1322	HQHTNWPLT	1323
CPA.7.045	GYTLTELS	1324	FDPEDGET	1325	ATEVGYCSGGSCYISYYYGMDV	1326	QSLLYRNGHNF	1327	LGS	1328	MQALQTPPT	1329
CPA.7.046	GGTFSSSA	1330	IIPIYGIT	1331	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1332	QTMNNY	1333	DAS	1334	QQYGDWLPIT	1335

Figura 63D

Nombre	Hcdr1	SEQ ID NO:	Hcdr2	SEQ ID NO:	Hcdr3	SEQ ID NO:	Lcdr1	SEQ ID NO:	Lcdr2	SEQ ID NO:	Lcdr3	SEQ ID NO:
CPA.7.047	GYTLTELS	1336	FDPEDGET	1337	ATAFPEATISYYYMDV	1338	QSLLYRNGYNY	1339	WGS	1340	MQAVQNPPT	1341
CPA.7.049	GGTFSSSA	1342	IIPIYGIT	1343	ARDDTARRVRGVPYYYYYAMDV	1344	RSLLDSDDGNTH	1345	SLS	1346	MQRKEFPLT	1347
CPA.7.050	GGTFSSYA	1348	IIPIFGTA	1349	ARGPWYYDSSGYSSYAYYMDV	1350	QSLLHSDGYNY	1351	LGS	1352	MQALHTPGVT	1353

Figura 64A

Enfermedad	CD8A	CD4	CD3G	PD-1
Carcinoma de célula clara renal de riñón	0.89	0.75	0.83	0.9
Sarcoma	0.87	0.64	0.88	0.82
Carcinoma hepatocelular de hígado	0.86	0.6	0.78	0.63
Melanoma cutáneo de la piel	0.86	0.77	0.87	0.89
Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello	0.85	0.72	0.82	0.86
Carcinoma invasivo de mama	0.84	0.67	0.81	0.85
Tumores de célula germinal testiculares	0.84	0.66	0.88	0.84
Adenocarcinoma de estómago	0.8	0.66	0.78	0.78
Mesotelioma	0.79	0.63	0.8	0.67
Carcinoma de tiroides	0.79	0.72	0.87	0.83
Carcinoma de célula escamosa de pulmón	0.78	0.65	0.77	0.81
Cromófobo de riñón	0.77	0.6	0.7	0.71
Adenocarcinoma pancreático	0.77	0.57	0.76	0.8
Adenocarcinoma de recto	0.77	0.69	0.68	0.72
Carcinoma endometrial de cuerpo uterino	0.77	0.68	0.75	0.7

Figura 64B

Carcinoma urotelial de vejiga	0.76	0.68	0.81	0.82
Adenocarcinoma de pulmón	0.76	0.52	0.74	0.77
Adenocarcinoma de próstata	0.76	0.73	0.72	0.76
Carcinoma de célula escamosa cervical y adenocarcinoma endocervical	0.74	0.64	0.76	0.7
Adenocarcinoma de colon	0.74	0.71	0.75	0.67
Carcinoma de célula papilar renal de riñón	0.69	0.51	0.66	0.61
Carcinosarcoma uterino	0.69	0.4	0.59	0.58
Cistadenocarcinoma seroso de ovario	0.67	0.64	0.66	0.6
Carcinoma esofágico	0.63	0.57	0.66	0.65
Leucemia mieloide aguda	0.58	-0.15	0.56	0.29
Feocromocitoma y paraganglioma	0.57	0.33	0.42	0.49
Carcinoma adrenocortical	0.55	0.49	0.66	0.64

Figura 65

Anticuerpos	Isotipo	Conjugado a	Fabricante	Número de catálogo	Concentración (ug/ul)	Concentración de tinción
Anti-PVRIG humana - CPA.7.021	IgG2 humana	AF-647	Compugen	CPA.7.021	0.2	7.5 ug/ml
IgG2 humana control isotipo	IgG2 humana	AF-647	Compugen		0.2	7.5 ug/ml
Anti-CD4	mIgG1	FITC	Biolegend	300506	0.4	4 ug/ml
Anti-CD8	mIgG1	FITC	Biolegend	300906	0.15	1.5 ug/ml
Anti-CD137	mIgG1	PE	Biolegend	309804	0.2	2 ug/ml
Anti-PD1	mIgG1	APC-cy7	Biolegend	329922	0.2	4 ug/ml
control isotipo	mIgG1	PE	Biolegend	400112	0.4	2 ug/ml
control isotipo	mIgG1	APC-cy7	Biolegend	400128	0.2	4 ug/ml

Figura 66A

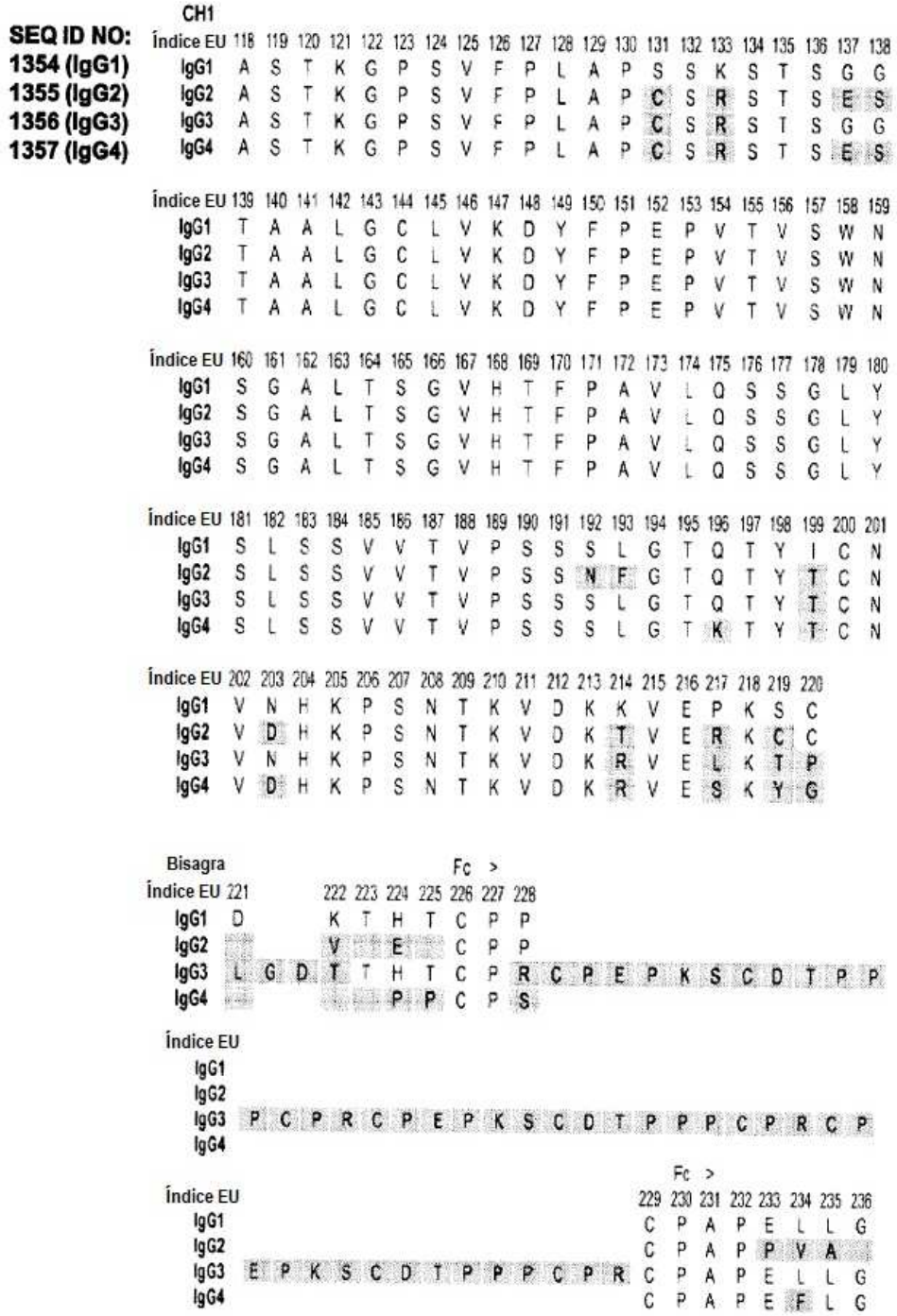

CH1
SEQ ID NO:
1354 (IgG1)
1355 (IgG2)
1356 (IgG3)
1357 (IgG4)
Índice EU 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138
IgG1 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G
IgG2 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S
IgG3 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G
IgG4 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S
Índice EU 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159
IgG1 T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG2 T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG3 T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG4 T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
Índice EU 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
IgG1 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG2 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG3 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG4 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
Índice EU 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201
IgG1 S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
IgG2 S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N
IgG3 S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y T C N
IgG4 S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N
Índice EU 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220
IgG1 V N H K P S N T K V D K K V E P K S C
IgG2 V D H K P S N T K V D K T V E R K C C
IgG3 V N H K P S N T K V D K R V E L K T P
IgG4 V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G
Bisagra
Fc >
Índice EU 221 222 223 224 225 226 227 228
IgG1 D K T H T C P P
IgG2 V E C P P
IgG3 L G D T T H T C P R C P E P K S C D T P P
IgG4 P P C P S
Índice EU
IgG1
IgG2
IgG3 P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P
IgG4
Fc >
Índice EU 229 230 231 232 233 234 235 236
IgG1 C P A P E L L G
IgG2 C P A P P V A
IgG3 E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G
IgG4 C P A P E F L G

Figura **66B**

CH2

SEQ ID NO:	Índice EU	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
1354 (IgG1)	IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P
1355 (IgG2)	IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P
1356 (IgG3)	IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P
1357 (IgG4)	IgG4	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P

	Índice EU	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278
	IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y
	IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y
	IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	K	W	Y
	IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y

	Índice EU	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299
	IgG1	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T
	IgG2	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T
	IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T
	IgG4	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T

	Índice EU:	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
	IgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K
	IgG2	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K
	IgG3	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K
	IgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K

	Índice EU	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
	IgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K
	IgG2	C	K	V	S	N	K	G	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K
	IgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K
	IgG4	C	K	V	S	N	K	G	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K

CH3

	Índice EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361
	IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N
	IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N
	IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N
	IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N

	Índice EU	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382
	IgG1	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E
	IgG2	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E
	IgG3	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E
	IgG4	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E

	Índice EU	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403
	IgG1	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S
	IgG2	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S
	IgG3	S	S	G	Q	P	E	N	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S
	IgG4	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S

Figura 66C

SEQ ID NO:	Índice EU	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
1354 (IgG1)	IgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S
1355 (IgG2)	IgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S
1356 (IgG3)	IgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	I	F	S
1357 (IgG4)	IgG4	F	F	L	Y	S	R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S

Índice EU	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445
IgG1	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P
IgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P
IgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	R	F	T	Q	K	S	L	S	L	S	P
IgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L

Índice EU	446	447
IgG1	G	K
IgG2	G	K
IgG3	G	K
IgG4	G	K

Figura 67

PVRIG ECD Fragmento A TTLAVLHPERGIRQWAPARQA (SEQ ID NO: 1358)

PVRIG ECD Fragmento B TTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILE (SEQ ID NO: 1359)

PVRIG ECD Fragmento C ARQARWETQSSISLILE (SEQ ID NO: 1360)

PVRIG ECD Fragmento D TFCCKFASFPEGSWEA (SEQ ID NO: 1361)

PVRIG ECD Fragmento E TFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSS (SEQ ID NO: 1362)

PVRIG ECD Fragmento F EATELSSFTIRCGFL (SEQ ID NO: 1363)

PVRIG ECD Fragmento G EVWVQVRMEATELSSFTIRCGF (SEQ ID NO: 1364)

PVRIG ECD Fragmento H FTIRCGFLGSGSISLVTVS (SEQ ID NO: 1365)

PVRIG ECD Fragmento I SISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLH (SEQ ID NO: 1366)

PVRIG ECD Fragmento J SISLILEGSGASSPCANTTFCCKFAS (SEQ ID NO: 1367)

Figura 68

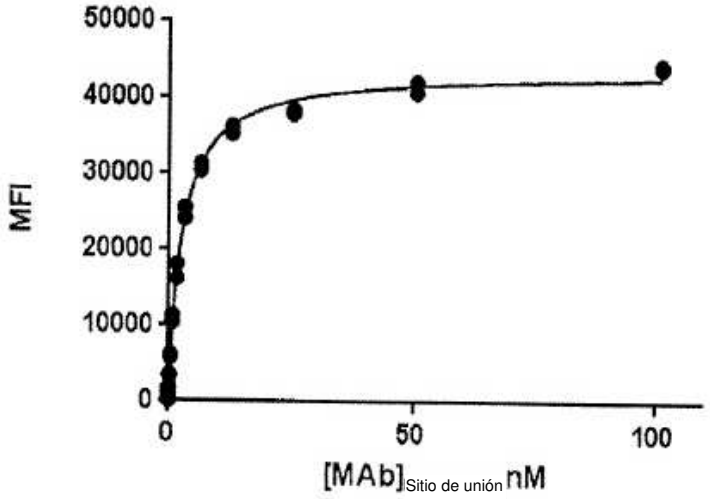
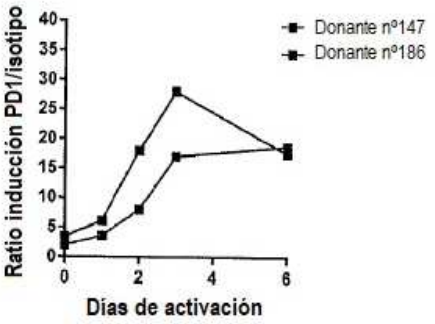

50000
40000
30000
20000
10000
0
MFI
0
50
100
[MAb]Sitio de unión nM

Figura 69A



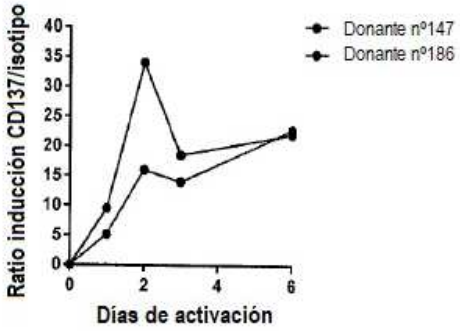
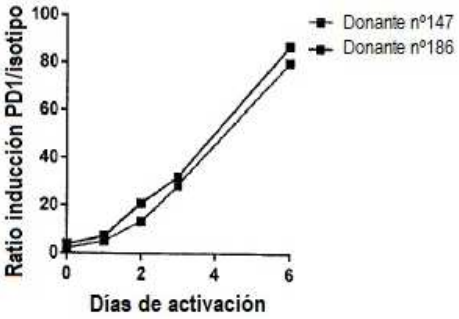


Figura 69B



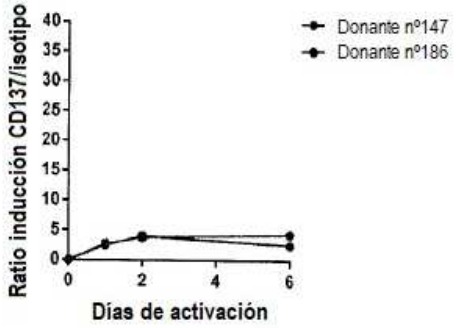


Figura 69C

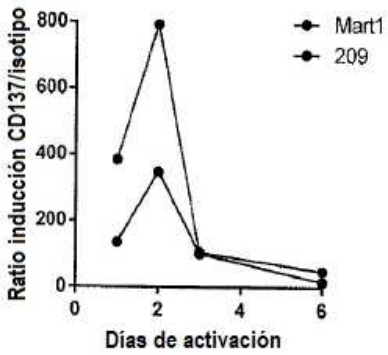


Figura 70A

A

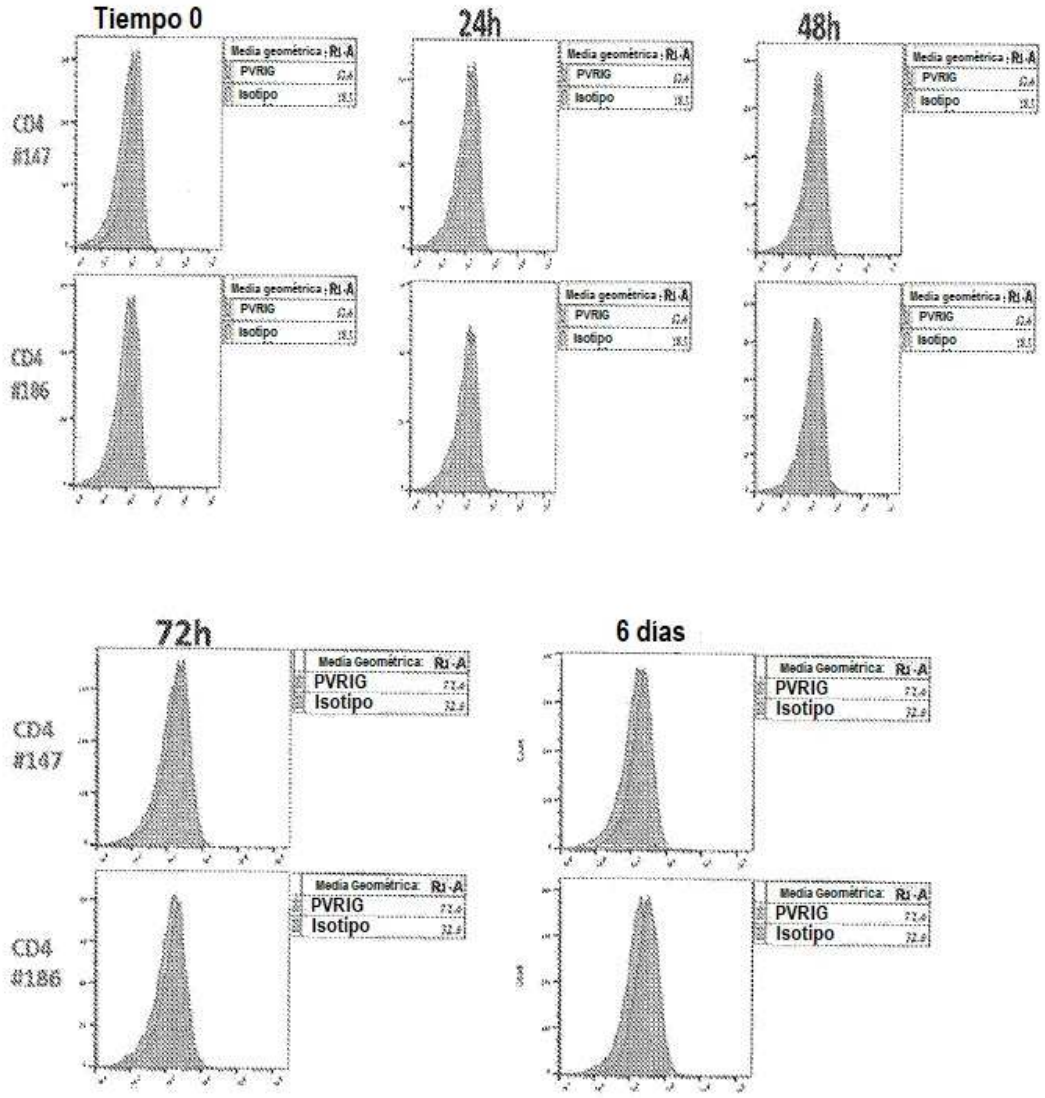

Tiempo 0
24h
48h
72h
6 días
CD4
#147
CD4
#186
Media geométrica : R1-A
Media Geométrica: R1-A
PVRIG
Isotipo

Figura 70B

B

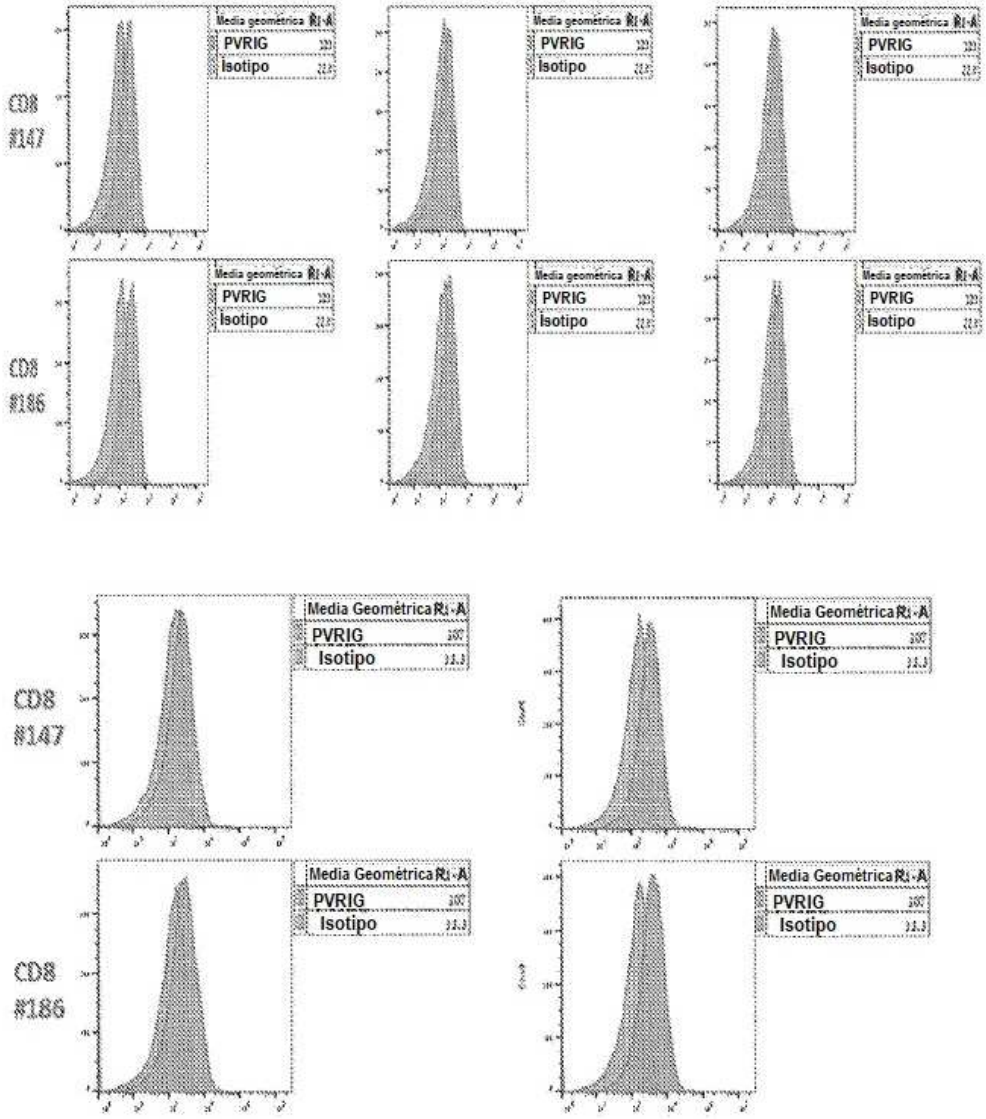

CD8
#147
CD8
#186
Media geométrica R1-A
PVRIG
Isotipo
Media Geométrica R1-A
PVRIG
Isotipo

Figura 70C

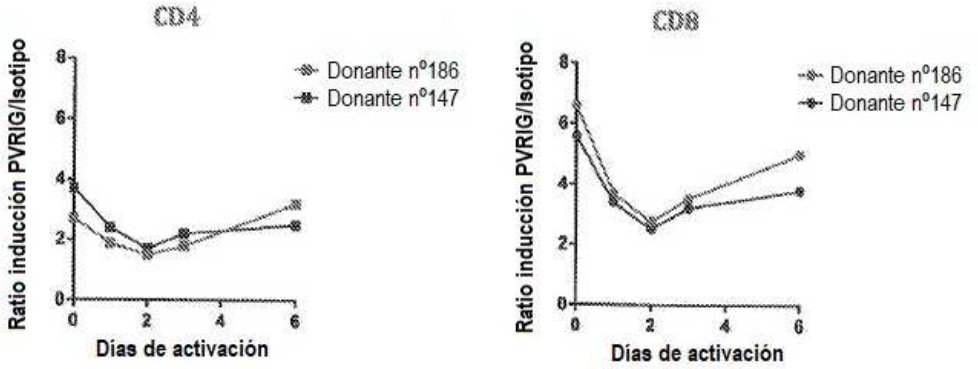

CD4
Ratio inducción PVRIG/Isotipo
Días de activación
Donante nº186
Donante nº147
CD8
Ratio inducción PVRIG/Isotipo
Días de activación
Donante nº186
Donante nº147

Figura 71A

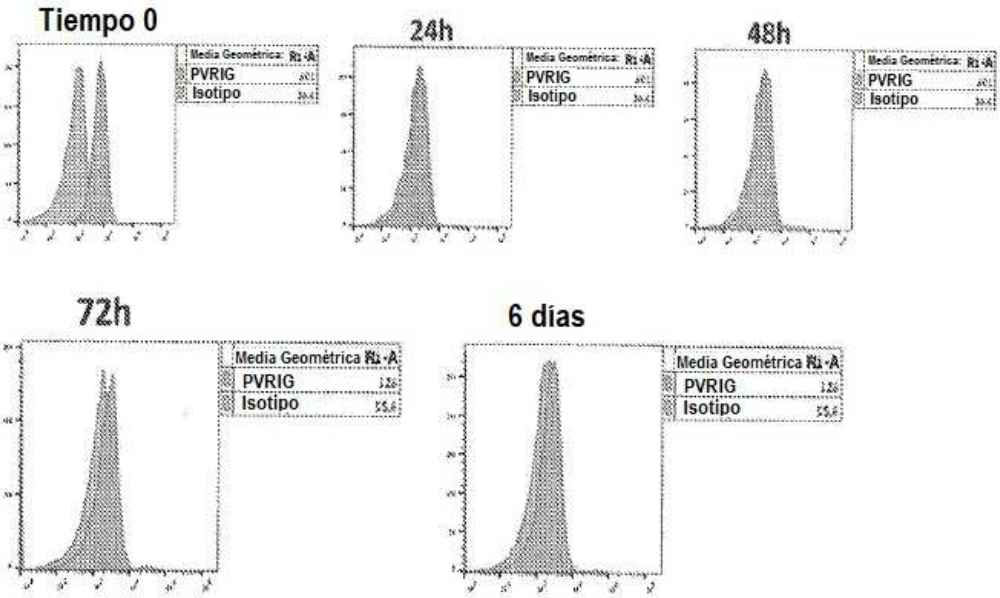


Figura 71B

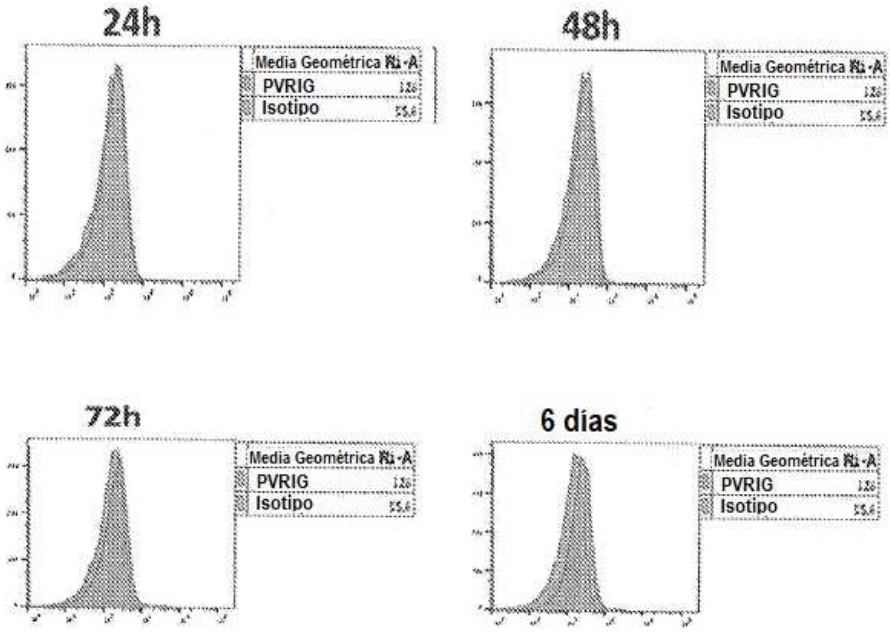


Figura 71C

C

Ratio inducción PVRIG/isotipo
8
6
4
2
0
0
2
4
6
Días de activación
209
Mart1

Figura 72

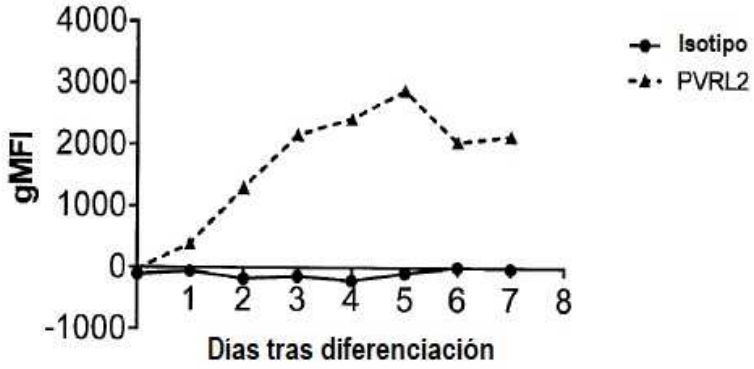

4000
3000
2000
1000
0
-1000
gMFI
1
2
3
4
5
6
7
8
Dias tras diferenciación
Isotipo
PVRL2

Figura 73A

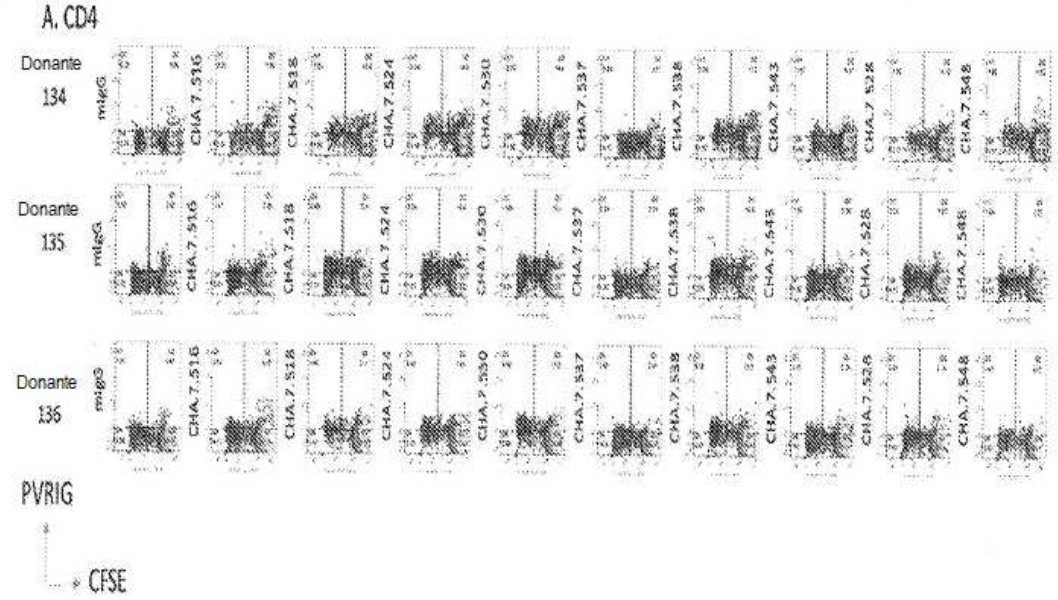


Figura 73B

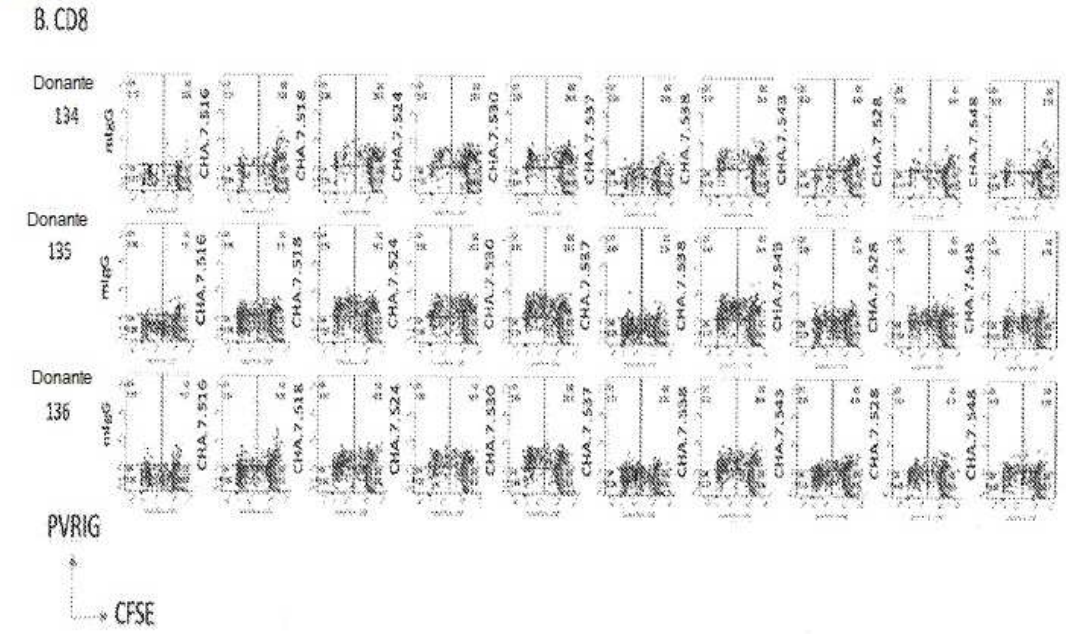


Figura 74B

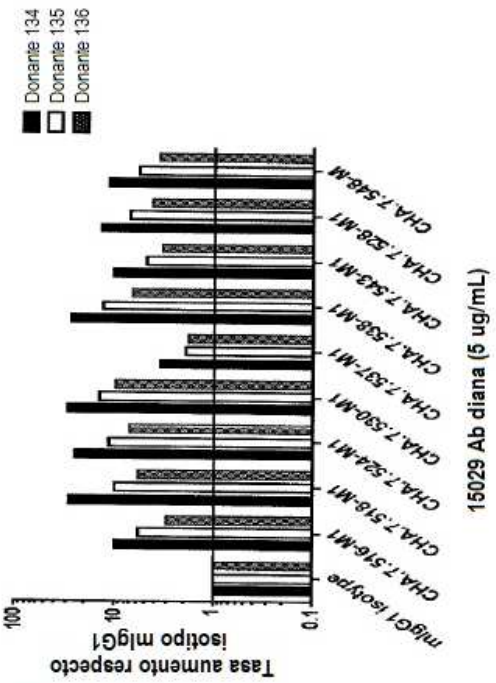


Figura 74A

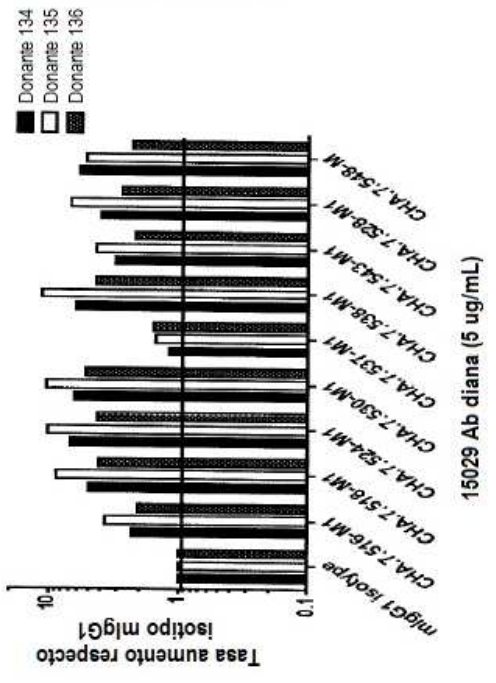


Figura 75B

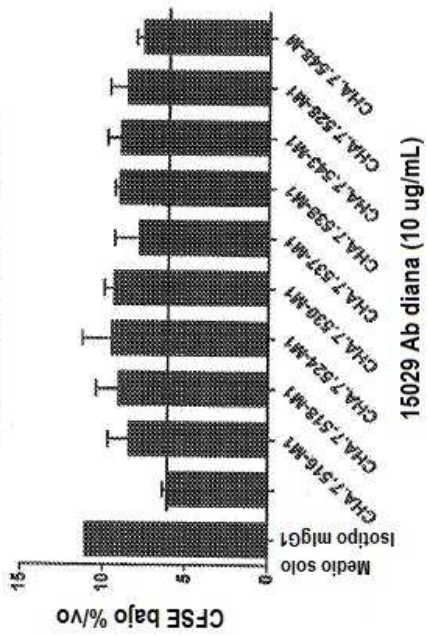


Figura 75A

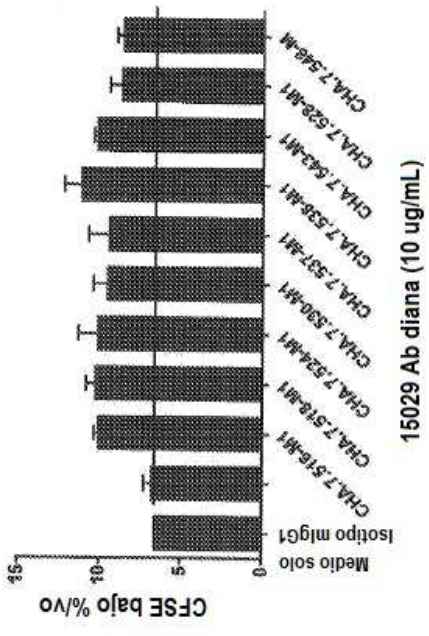


Figura 76

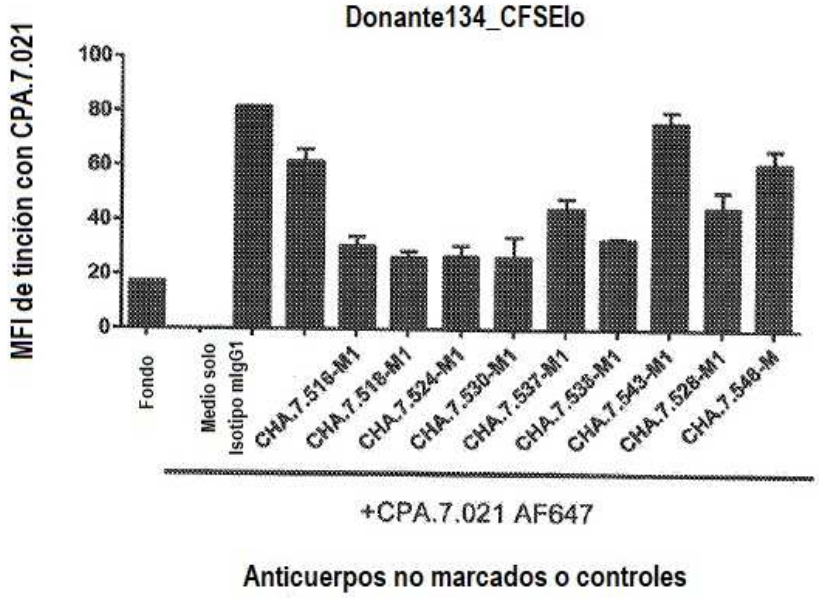

Donante134_CFSElo
MFI de tinción con CPA.7.021
100
80
60
40
20
0
Fondo
Medio solo
Isotipo mIgG1
CHA.7.515-M1
CHA.7.518-M1
CHA.7.524-M1
CHA.7.530-M1
CHA.7.537-M1
CHA.7.538-M1
CHA.7.543-M1
CHA.7.528-M1
CHA.7.548-M
+CPA.7.021 AF647
Anticuerpos no marcados o controles

Figura 77

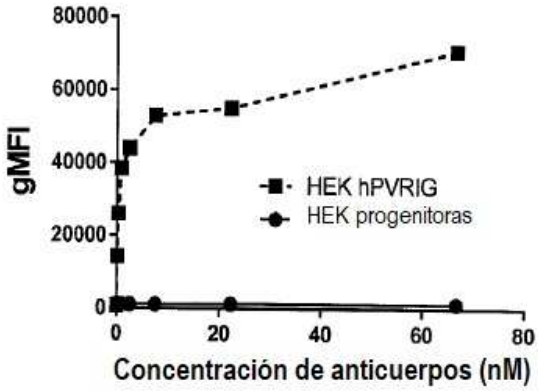

80000
60000
40000
20000
0
gMFI
HEK hPVRIG
HEK progenitoras
0
20
40
60
80
Concentración de anticuerpos (nM)

Figura 78

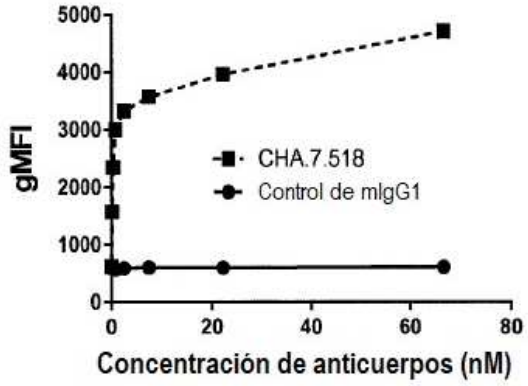

5000
4000
3000
2000
1000
0
gMFI
CHA.7.518
Control de mIgG1
0
20
40
60
80
Concentración de anticuerpos (nM)

Figura 79A

Anticuerpo (mIgG)	EC_{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

Figura 79B

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

Figura 80A

Anticuerpo (mIgG)	NK int. CD56 humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Expi cyno OE/par (gMFIr, 3.3ug/ml)	Células NK de cyno (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ de cyno (gMFIr, 10ug/ml)
CHA.7.502	1.97	1.41	60.49	No evaluado	No evaluado
CHA.7.503	3.15	1.96	106.3	No evaluado	No evaluado
CHA.7.506	No evaluado	No evaluado	0.77	No evaluado	No evaluado
CHA.7.508	3.6	4.09	41.49	No evaluado	No evaluado
CHA.7.510	3.13	2.73	38.21	No evaluado	No evaluado
CHA.7.512	1.30	1.15	8.96	No evaluado	No evaluado
CHA.7.514	4.16	5.15	65.20	No evaluado	No evaluado
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 evaluado	No evaluado	No evaluado
CHA.7.522	2.06	1.90	27.24	No evaluado	No evaluado

Figura 80B

CHA.7.524	5.50	6.12	66.32	1.78	2.02
CHA.7.525	1.98	1.76	0.85	No evaluado	No evaluado
CHA.7.526	2.08	1.71	0.79	No evaluado	No evaluado
CHA.7.527	1.16	0.99	No evaluado	No evaluado	No evaluado
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 evaluado	No evaluado
CHA.7.535	2.24	1.28	0.82	No evaluado	No evaluado
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 evaluado	No evaluado
CHA.7.545	2.54	2.82	0.91	No evaluado	No evaluado
CHA.7.546	2.75	2.95	0.85	No evaluado	No evaluado
CHA.7.547	2.21	1.13	26.65	No evaluado	No evaluado
CHA.7.548	3.15	3.35	4.25	1.18	1.09
CHA.7.549	3.05	1.42	1.00	No evaluado	No evaluado
CHA.7.550	1.60	1.29	0.90	No evaluado	No evaluado

Figura 81A

Anticuerpo (mIgG)	IC_{50} (nM)
CHA.7.502	39.90
CHA.7.503	No IC_{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 IC_{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 IC_{50}

Figura 81B

CHA.7.544	No IC_{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

Figura 82

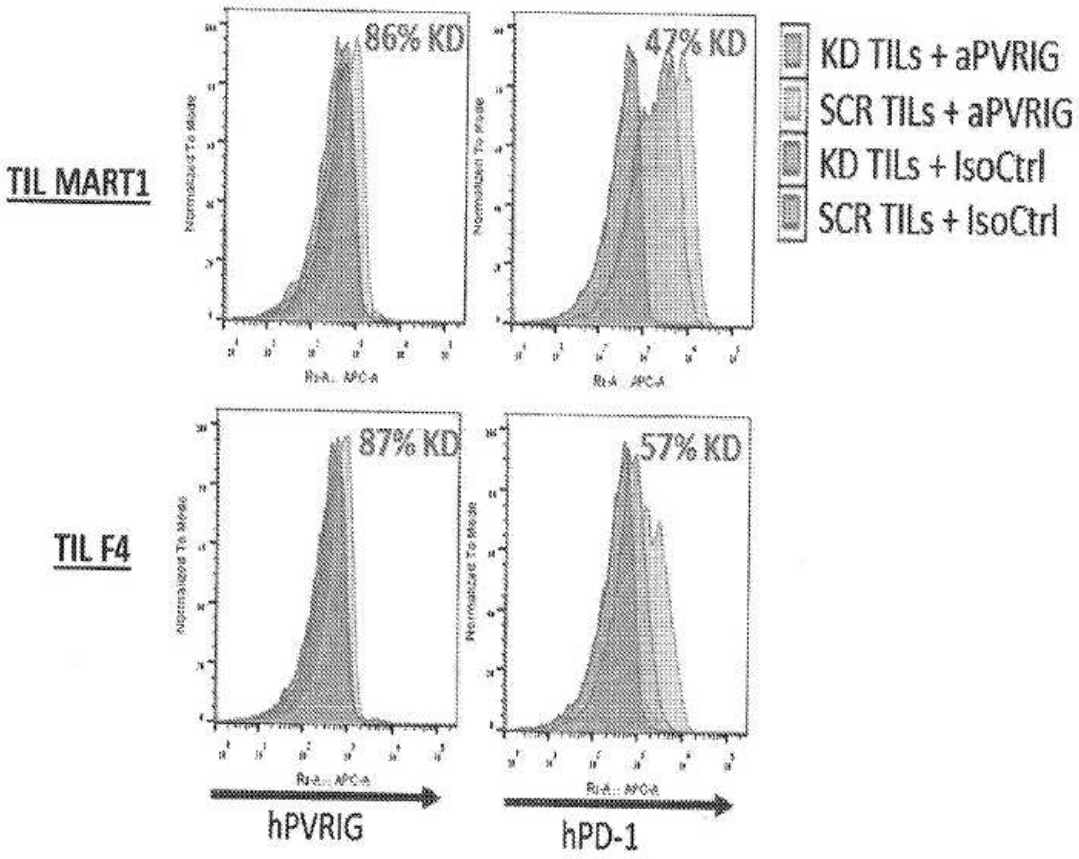

TIL MART1
86% KD
47% KD
KD TILs + aPVRIG
SCR TILs + aPVRIG
KD TILs + IsoCtrl
SCR TILs + IsoCtrl
TIL F4
87% KD
57% KD
hPVRIG
hPD-1

FIGURA 83A

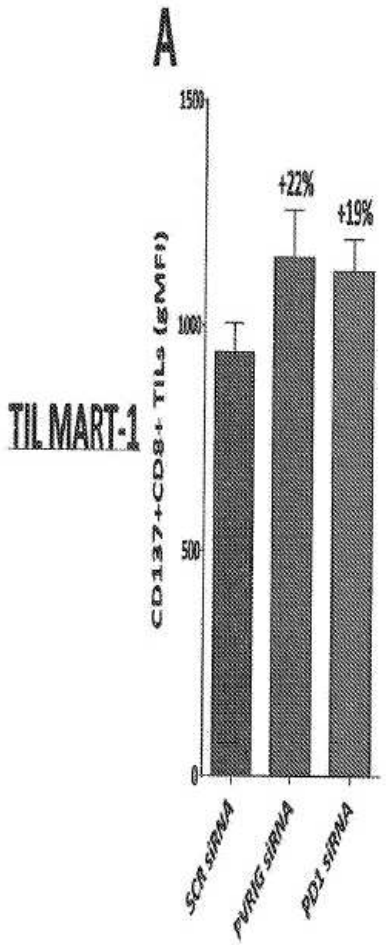


FIGURA 83B

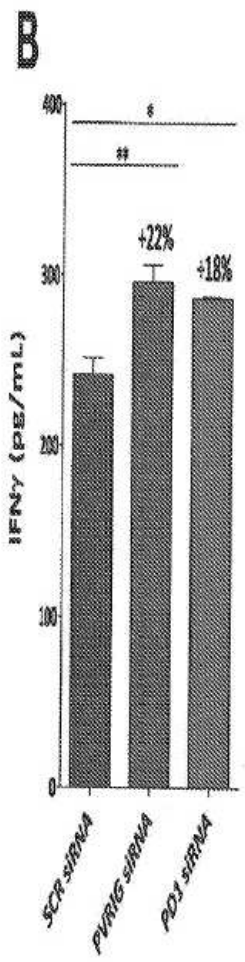
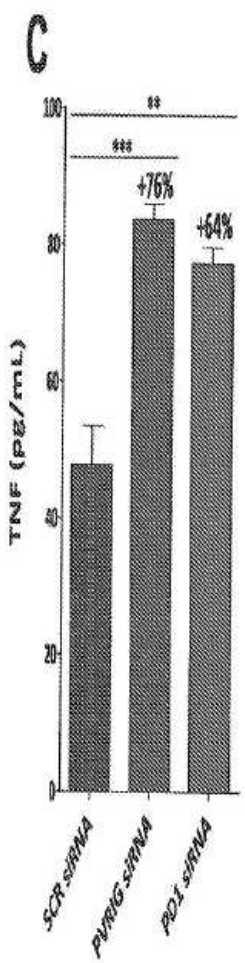


FIGURA 83C



TIL F4

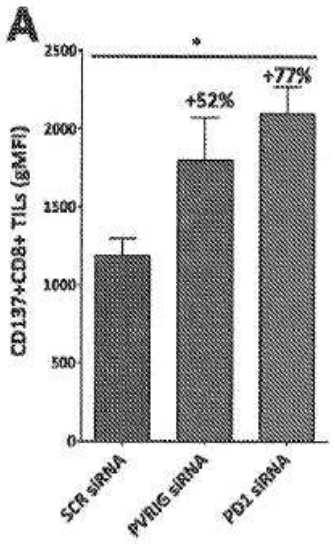


FIGURA 84A

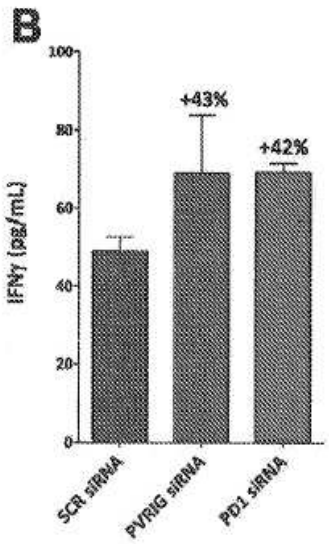


FIGURA 84B

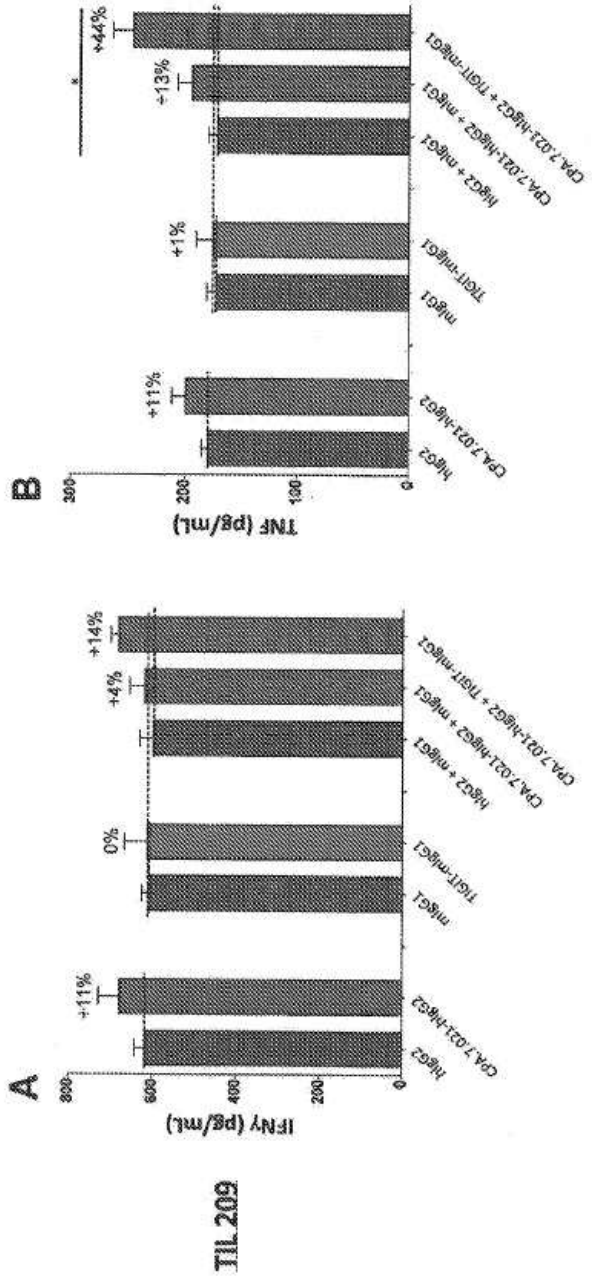


FIGURA 85A

FIGURA 85B

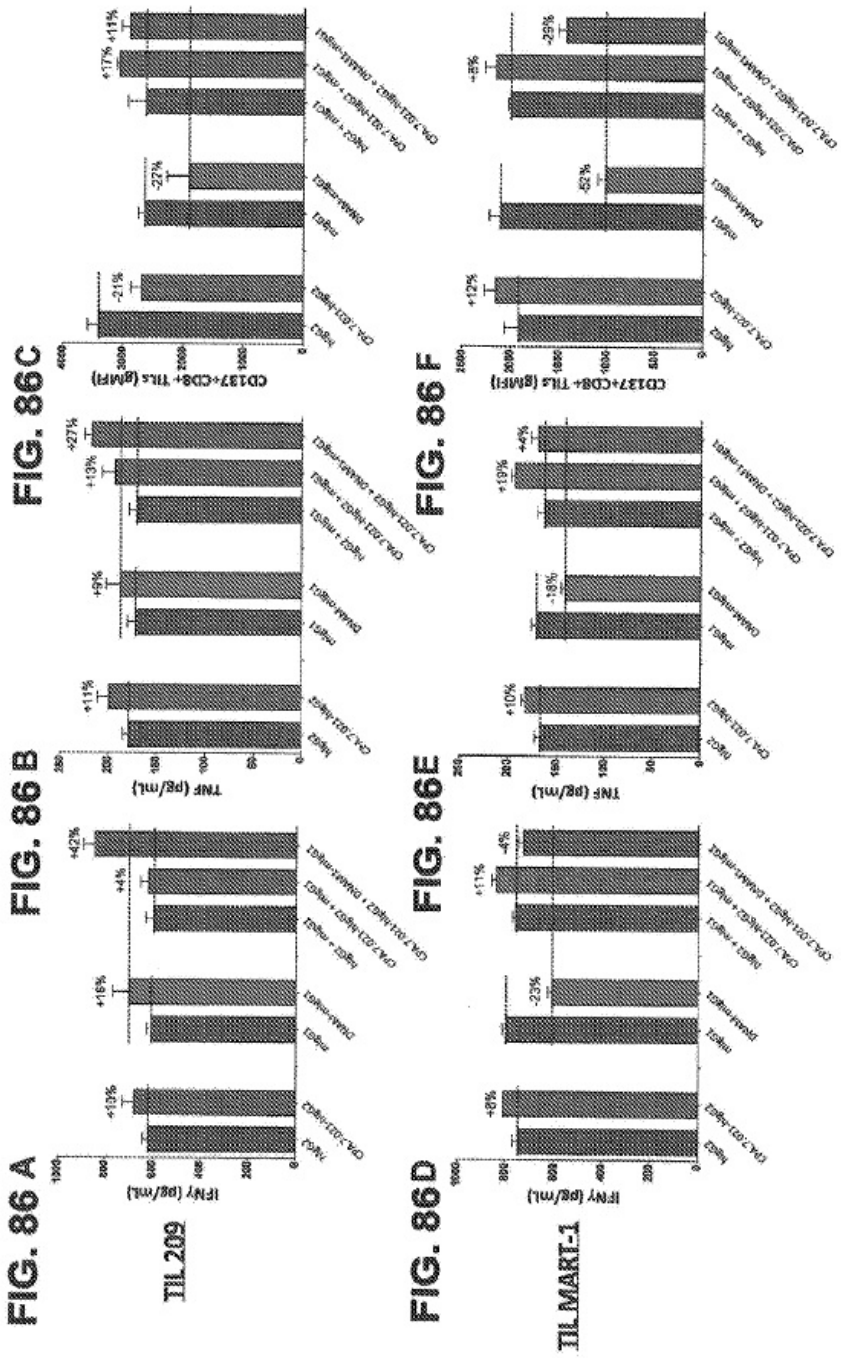


FIG. 86A
TIL209
IFNγ (pg/mL)
FIG. 86B
TNF (pg/mL)
FIG. 86C
CD137+CD8+ TILs (gMFI)
FIG. 86D
TILMART-1
IFNγ (pg/mL)
FIG. 86E
TNF (pg/mL)
FIG. 86F
CD137+CD8+ TILs (gMFI)

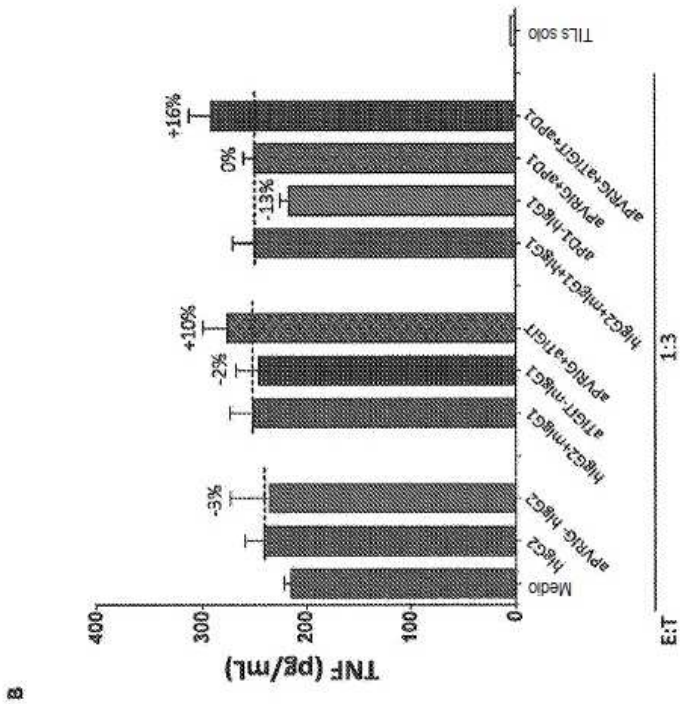


FIGURA 87B

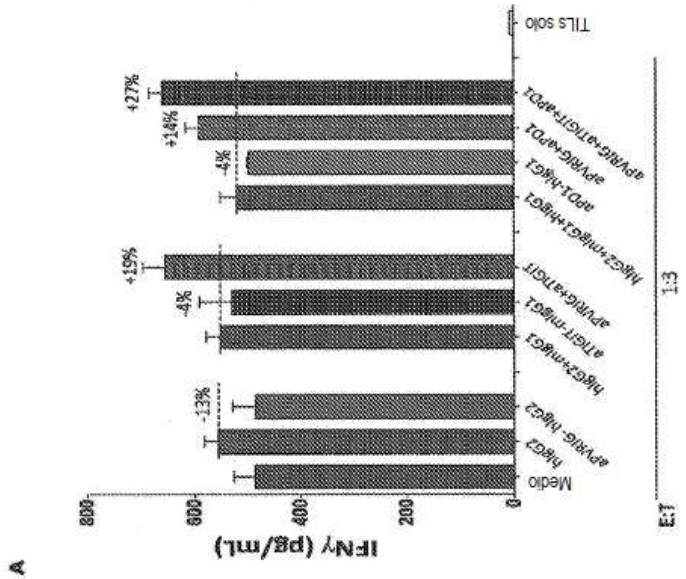


FIGURA 87A

Figura 88A

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.518

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora IMGT IGHV1 - 46*1 (definición de CDR de AbM)

```
IGHV1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
(SEQ ID NO: 1368)
```

Región de unión IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1369)

```
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: 1370)
                          *      (1-46*01 descrito como SEQ ID NO: 1371)
h518H1   EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1372)
h518H2   EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1373)
h518H3   EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1374)
h518H4   EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1375)
             #
```

sustituciones de desamidación: Q/S/A

Figura 88B

Secuencia humanizada de VL de anticuerpo CHA.7.518

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora IMGT IGKV1 - 39*01

```
IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO:
1376)
```

Región de unión `IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1377)`

```
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: 1378)
                        *
IGKV1-39   QQSYSTPP (SEQ ID NO: 1379)
h518L1     QHFWGTPYT  FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1380)
h518L2     QHFWGTPYT  FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1381)
h518L3     QHFWGTPYT  FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1382)
              @
```

sustituciones de desamidación: Q/S/A/D

@ sustituciones de oxidación de tripfófano: Y/F/H

Figura 88C

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.524

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGHV1 - 46*01

```
IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:
1383)
```

Región de unión `IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1384)`

```
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
524       QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGS GYKFPDYVMH WVKQSHAKSLEWIG IISIYSGNTN YNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAR
               *    *  **   *    *    *                 * *****    *          *    * **    * * *   *     ** *     * *
1-46*01   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h524H1    QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYKFPDYVMH WVRQAPGQGLEWMG IISIYSGNTN YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h524H2    QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYKFPDYVMH WVRQAPGQGLEWIG IISIYSGNTN YAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h524H3    QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKGS GYKFPDYVMH WVRQAPGQGLEWIG IISIYSGNTN YAQKFQGRATMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h524H4    QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKGS GYKFPDYVMH WVRQAPGQGLEWIG IISIYSGNTN YAQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
                       V                                           # #  N                                     I

seq      100         110
AbM                       110
                     i   b b b
524       EGDLPMFAY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 1385)
                              * (1-46*01 disclosed as SEQ ID NO: 1386)
h524H1    EGDLPMFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1387)
h524H2    EGDLPMFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1388)
h524H3    EGDLPMFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1389)
h524H4    EGDLPMFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1390)
              @
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A

@ Sustituciones de oxidación de metionina: L/F/A

Figura 88D

Secuencias humanizadas de VL de anticuerpo CHA.7.524

Secuenica humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGKV3 - 11*01

```
IGKV3-11*01
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPP (SEQ ID NO:
1391)
```

Región de unión `IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1392)`

```
seq               10        20         30         40         50         60        70        80
AbM               10        20         30         40         50         60        70        80
            b b b    p p    b b b  b    b    bi bi i     ii ibbi      i   b   b        b b b  b    ib bib
524         QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC NASSSVS-YMY WYQQKPISSPRLLIY DTSNLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTIGRMEAEDAATYYC
            *        ** *    ** **                     ***                * *            ***   *** *   * *
IGKV3-11    EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
h524L1      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC NASSSVS-YMY WYQQKPGQAPRLLIY DTSNLAS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
h524L2      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC NASSSVS-YMY WYQQKPGQAPRLLIY DTSNLAS GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC
h524L3      EIVLTQSPATLSLSPGERVTMSC NASSSVS-YMY WYQQKPGQAPRLLIY DTSNLAS GVPARFSGSGSGTDYTLTISSMEPEDFAVYYC
                      M A              #                   S          #                                A

seq          90         100
AbM         90         100
            ibi  iib   i   b b b
524         QQWSSYPLT FGAGTKVEVK (SEQ ID NO: 1393)
                        *    * *
IGKV3-11    QQRSNWPP (SEQ ID NO: 1394)
h524L1      QQWSSYPLT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1395)
h524L2      QQWSSYPLT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1396)
h524L3      QQWSSYPLT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1397)
              @                V
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A/D

@ Sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

Figura 88E

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.530

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGHV1 - 46*01

```
IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:
1398)
```

Región de unión `IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1399)`

```
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
530      QVQLQQSGAELMRPGTSVKVSCKAS GYAFTNHLIE WIKQRPGQGLEWIG VINPGSDSTD YNEKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
             *      ***   *                    ** *          *           **   **** *  *  *  *  *  *         * * *    *
1-46*01  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h530H1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNHLIE WVRQAPGQGLEWMG VINPGSDSTD YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h530H2   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNHLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSDSTD YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h530H3   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNHLIE WIRQAPGQGLEWIG VINPGSDSTD YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h530H4   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNHLIE WIRQAPGQGLEWIG VINPGSDSTD YAQKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
                     M                  #                      #        N                                         F

seq        100          110
AbM                          110
                        i   b b b
530        SLYYNSWFVY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 1400)
                                * (1-46*01 disclosed as SEQ ID NO: 1401)
h530H1     SLYYNSWFVY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1402)
h530H2     SLYYNSWFVY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1403)
h530H3     SLYYNSWFVY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1404)
h530H4     SLYYNSWFVY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1405)
                # @
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A

@ Sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

Figura 88F

Secuencias humanizadas de VL de anticuerpo CHA.7.530

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGKV1 - 39*01 (definición de CDR AbM)

```
IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO:
1406)
Región de unión      IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1407)

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
530         DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RASENIYSYLA WYQQKRGKSPQLLVY NAKTLVE GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC
                     *        **                     *   *  *   *                         *  *  *  *      **
IGKV1-39    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h530L1      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASENIYSYLA WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLVE GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h530L2      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASENIYSYLA WYQQKPGKAPKLLVY NAKTLVE GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFGTYYC
                                        #                 S       #

seq         90         100
AbM         90         100
            ibi  iib   i   b b b
530         QHHYGTPYT  FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1408)
                        *
IGKV1-39    QQSYSTPP  (SEQ ID NO: 1409)
h530L1      QHHYGTPYT  FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1410)
h530L2      QHHYGTPYT  FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1411)
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A/D

Figura 88G

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.538_1

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGHV1 - 46*01

```
IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:
1412)
```

Región de unión `IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1413)`

```
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: 1414)
                             * (1-46*01 disclosed as SEQ ID NO: 1415)
h5381H1 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1416)
h5381H2 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1417)
h5381H3 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1418)
h5381H4 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1419)
              @
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A

@ Sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

Figura 88H

Secuencias humanizadas de VL de anticuerpo CHA.7.538_1

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGKV1 - 39*01

IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO: 1420)

Región de unión   **IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK** (SEQ ID NO: 1421)

IGKV1-17*02
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLQHNSYPP (SEQ ID NO: 1422)

```
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: 1423)
                      *
IGKV1-39  QQSYSTPP (SEQ ID NO: 1424)
h538L1    LQHWNYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1425)
h538L2    LQHWNYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1426)
             @#
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A/D

@ Sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

Figura 88I

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.538_2

Secuencia humanizada potencial basada en estructura aceptora de IMGT IGHV1 - 46*01

```
IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:
1427)
```

Región de unión

```
IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1428)

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  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWIG DIYPGGGYTN YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS
                    V                     # @                            #  N                                      I

seq        100          110
AbM                          110
                       i   b b b
538_2    PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 1429)
                               * (1-46*01 disclosed as SEQ ID NO: 1430)
h5382H1  PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1431)
h5382H2  PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1432)
h5382H3  PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1433)
```

Sustituciones de desamidación: Q/S/A

@ Sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

Figura 89A

VH de CHA.7.518 humanizado

h518HH1
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1434)

h518HH2
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTADTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1435)

h518HH3
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1436)

h518HH4
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQGRATLTADNSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1437)

VH de CHA.7.524 humanizado

h524HH1
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFPDYVMHWVRQAPGQGLEWMGIISIYSGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV
YMELSSLRSEDTAVYYCAREGDLPMFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1438)

h524HH2
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFPDYVMHWVRQAPGQGLEWIGIISIYSGNTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCAREGDLPMFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1439)

h524HH3
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKGSGYKFPDYVMHWVRQAPGQGLEWIGIISIYSGNTNYAQKFQGRATMTVDTSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCAREGDLPMFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1440)

ES 2 806 800 T3

Figura 89B

h524HH4
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKGSGYKFPDYVMHWVRQAPGQGLEWIGIISIYSGNTNYAQKFQGRATMTVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCAREGDLPMFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1441)

VH de CHA.7.530 humanizado

h530HH1
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNHLIEWVRQAPGQGLEWMGVINPGSDSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARSLYYNSWFVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1442)

h530HH2
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNHLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSDSTDYAQKFQGRVTMTADTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARSLYYNSWFVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1443)

h530HH3
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNHLIEWIRQAPGQGLEWIGVINPGSDSTDYAQKFQGRATLTADTSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCARSLYYNSWFVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1444)

h530HH4
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNHLIEWIRQAPGQGLEWIGVINPGSDSTDYAQKFQGRATLTADKSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCARSLYYNSWFVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1445)

VH de CHA.7.538_1 humanizado

h5381HH1
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1446)

h5381HH2
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1447)

Figura 89C

h5381HH3
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1448)

h5381HH4
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1449)

VH de CHA.7.538_2 humanizado

h5382HH1
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGGYTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV
YMELSSLRSEDTAVYYCARPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1450)

h5382HH2
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYAQKFQGRVTMTADTSTSTV
YMELSSLRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1451)

h5382HH3
QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYAQKFQGRATLTADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1452)

VL de CHA.7.518 humanizado

h518HL1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1453)

h518HL2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA
TYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1454)

Figura 89D

h518HL3
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDF
GTYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1455)

VL de CHA.7.524 humanizado

h524HL1
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY
YCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1456)

h524HL2
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVY
YCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1457)

h524HL2
EIVLTQSPATLSLSPGERVTMSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSMEPEDFA
VYYCQQWSSYPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1458)

VL de CHA.7.530 humanizado

h530HL1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQHHYGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1459)

h530HL2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKTLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFG
TYYCQHHYGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1460)

VL de CHA.7.538_1/538_2 humanizado

h538HL1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWYQQKPGKAPKLLIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1461)

Figura 89E

h538HL2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFA
TYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1462)

Figura 90: pares VH-VL de CHA.7 humanizado

Anticuerpo CHA.7.518

	VH	VL
ch518	chimVH	chimVL
h518-1	h518HH1	h518HL1 (opcional)
h518-2	h518HH2	h518HL2
h518-3	h518HH3	h518HL2
h518-4	h518HH3	h518HL3
h518-5	h518HH4	h518HL3

Anticuerpo CHA.7.524

	VH	VL
ch524	chimVH	chimVL
h524-1	h524HH1	h524HL1 (opcional)
h524-2	h524HH2	h524HL2
h524-3	h524HH3	h524HL3
h524-4	h524HH4	h524HL3

Anticuerpo CHA.7.530

	VH	VL
ch530	chimVH	chimVL
h530-1	h530HH1	h530HL1 (opcional)
h530-2	h530HH2	h530HL2
h530-3	h530HH3	h530HL1
h530-4	h530HH3	h530HL2
h530-5	h530HH4	h530HL2

Anticuerpo CHA.7.538_1

	VH	VL
ch538.1	chimVH	chimVL
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	chimVH	chimVL
h538.2-1	h538.2HH1	h538.1HL1 (opcional)
h538.2-2	h538.2HH2	h538.1HL2
h538.2-3	h538.2HH3	h538.1HL2

Figura 91

Anticuerpo (mIgG)	NK int. CD56 humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ humanas (gMFIr, 10ug/ml)	Expi cyno OE/par (gMFIr, 3.3ug/ml)	Células NK de Cyno (gMFIr, 10ug/ml)	Células T CD8+ de Cyno (gMFIr, 10ug/ml)
CHA.7.502	1.97	1.41	60.49	No evaluado	No evaluado
CHA.7.503	3.15	1.96	106.3	No evaluado	No evaluado
CHA.7.506	No evaluado	No evaluado	0.77	No evaluado	No evaluado
CHA.7.508	3.6	4.09	41.49	No evaluado	No evaluado
CHA.7.510	3.13	2.73	38.21	No evaluado	No evaluado
CHA.7.512	1.30	1.15	8.96	No evaluado	No evaluado
CHA.7.514	4.16	5.15	65.20	No evaluado	No evaluado
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 evaluado	No evaluado	No evaluado
CHA.7.522	2.06	1.90	27.24	No evaluado	No evaluado
CHA.7.524	5.50	6.12	66.32	1.78	2.02
CHA.7.525	1.98	1.76	0.85	No evaluado	No evaluado
CHA.7.526	2.08	1.71	0.79	No evaluado	No evaluado
CHA.7.527	1.16	0.99	No evaluado	No evaluado	No evaluado
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 evaluado	No evaluado
CHA.7.535	2.24	1.28	0.82	No evaluado	No evaluado
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 evaluado	No evaluado
CHA.7.545	2.54	2.82	0.91	No evaluado	No evaluado
CHA.7.546	2.75	2.95	0.85	No evaluado	No evaluado
CHA.7.547	2.21	1.13	26.65	No evaluado	No evaluado
CHA.7.548	3.15	3.35	4.25	1.18	1.09
CHA.7.549	3.05	1.42	1.00	No evaluado	No evaluado
CHA.7.550	1.60	1.29	0.90	No evaluado	No evaluado

Figura 92

Anticuerpo (mIgG)	IC_{50} (nM)
CHA.7.502	39.90
CHA.7.503	No IC_{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 IC_{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 IC_{50}
CHA.7.544	No IC_{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

FIGURA 93A

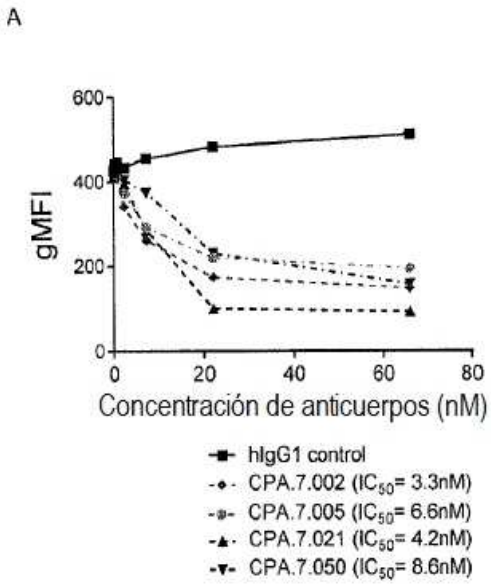
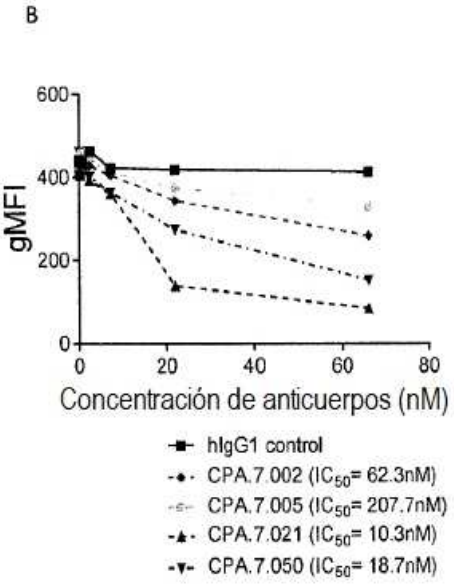


FIGURA 93B



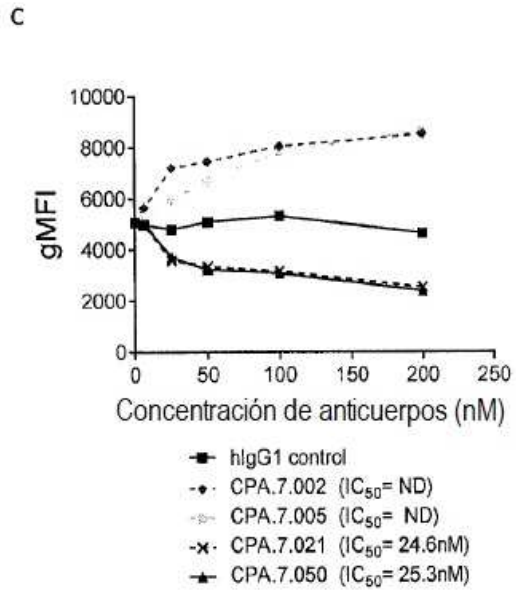
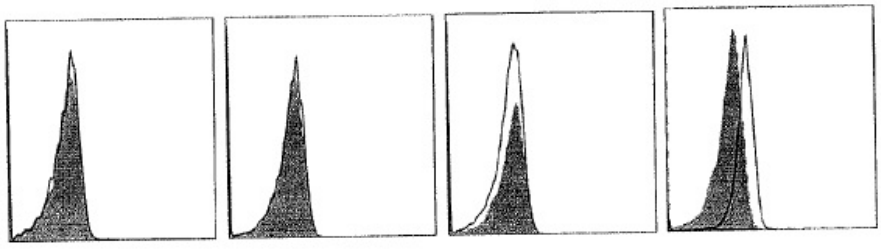


FIGURA 93C

FIG. 94A FIG. 94B FIG. 94C FIG. 94D

a b c d



e f g h

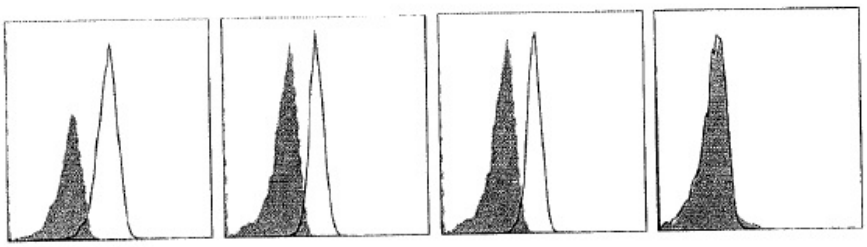


FIG. 94E FIG. 94F FIG. 94G FIG. 94H

FIG. 95A

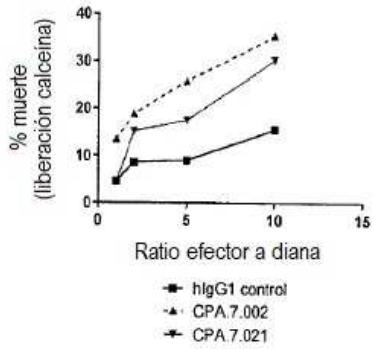


FIG. 95B

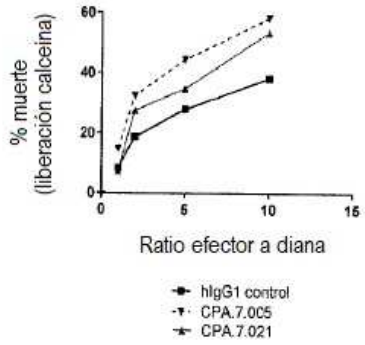


FIG. 95C

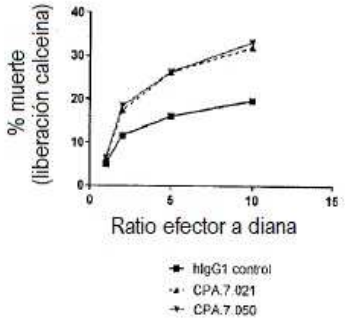


FIG. 95D

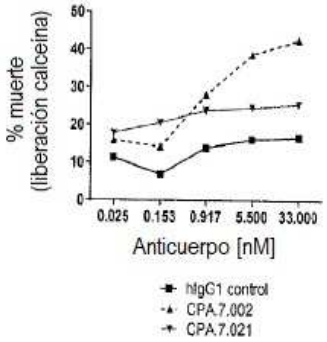


FIG. 95E

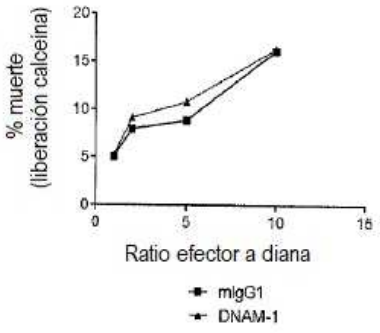


FIG. 95F

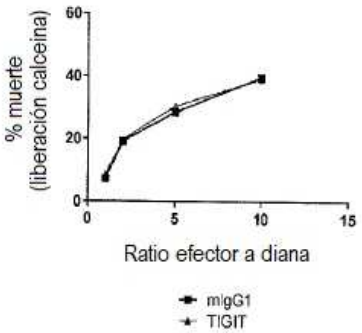
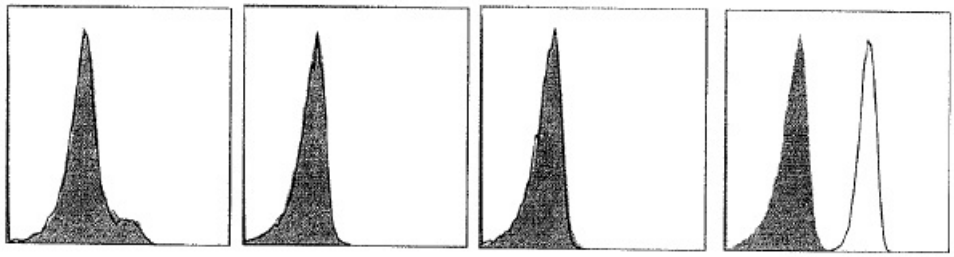


FIG. 96A FIG. 96B FIG. 96C FIG. 96D

a b c d



e f g h

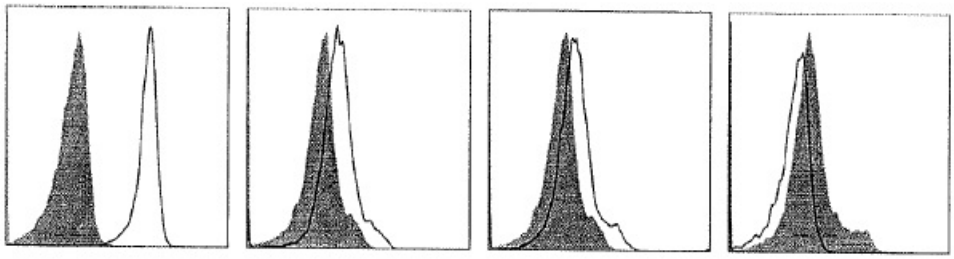
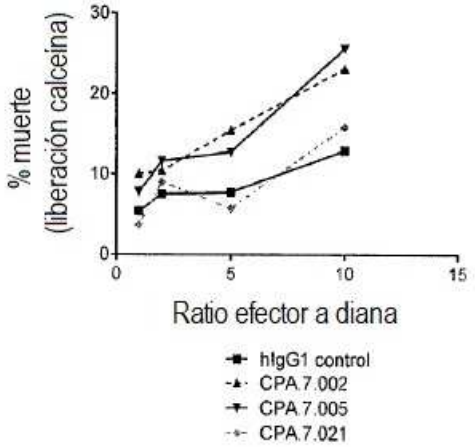


FIG. 96E FIG. 96F FIG. 96G FIG. 96H

A

FIGURA 97A



B

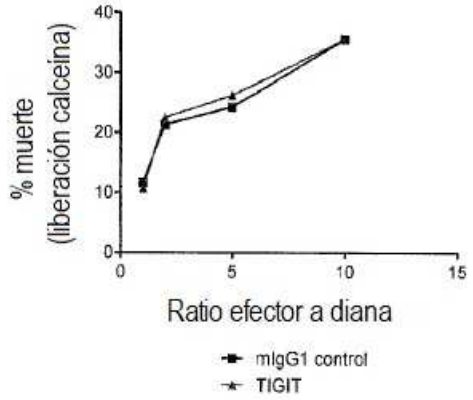


FIGURA 97B

Figura 98

Anticuerpo (hIgG1)	Permutación y orientación de ensayo	IC_{50} (nM)
CPA.7.002	HEK + PVRIG Fc (P)	3.3
	HEK + PVRIG Fc (NP)	62.3
	HEK hPVRIG + PVRL2 Fc	Unión incrementada
CPA.7.005	HEK + PVRIG Fc (P)	6.6
	HEK + PVRIG Fc (NP)	207.7
	HEK hPVRIG + PVRL2 Fc	Unión incrementada
CPA.7.021	HEK + PVRIG Fc (P)	4.2
	HEK + PVRIG Fc (NP)	10.3
	HEK hPVRIG + PVRL2 Fc	24.6
CPA.7.036	HEK + PVRIG Fc (P)	6.9
	HEK + PVRIG Fc (NP)	10.9
CPA.7.037	HEK + PVRIG Fc (P)	6.5
	HEK + PVRIG Fc (NP)	19.1
CPA.7.038	HEK + PVRIG Fc (P)	3.5
	HEK + PVRIG Fc (NP)	6.7
CPA.7.039	HEK + PVRIG Fc (P)	14.0
	HEK + PVRIG Fc (NP)	32.7
CPA.7.041	HEK + PVRIG Fc (P)	5.8
	HEK + PVRIG Fc (NP)	16.2
CPA.7.042	HEK + PVRIG Fc (P)	3.6
	HEK + PVRIG Fc (NP)	8.3
CPA.7.050	HEK + PVRIG Fc (P)	8.6
	HEK + PVRIG Fc (NP)	18.7
	HEKhPVRIG + PVRL2 Fc	25.3

Figura 99

Anticuerpo (hIgG1)	Linea celular diana	Tasa de cambio en 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

Figura 100

```
NP_076975.2-Homosapiens                TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQW
XP_005549281.1-Macacafascicularis      TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQW
XP_003732227.1-Callithrixjacchus       TPEVWVQVQMKATELSSFIVHCGFLGSGSISLVTVSWGGPDGAGGTRLAVLHPELGTRQW
XP_001103603.1-Macacamulatta           TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQW

NP_076975.2-Homosapiens                APARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA
XP_005549281.1-Macacafascicularis      APARQARWETQSSISLALEDSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSA
XP_003732227.1-Callithrixjacchus       APARQARWETQSSISLVLEEPGASSPSANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA
XP_001103603.1-Macacamulatta           APARQARWETQSSISLALEDSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSA

NP_076975.2-Homosapiens                PPTPAPILRAD
XP_005549281.1-Macacafascicularis      PPTPVPILRAD
XP_003732227.1-Callithrixjacchus       EIL-----RAD
XP_001103603.1-Macacamulatta           PPTPVPILRAD
                                       *       ***
```

SEQ ID NOS 1463-1466, respectivamente, en orden de aparición

Figura 101

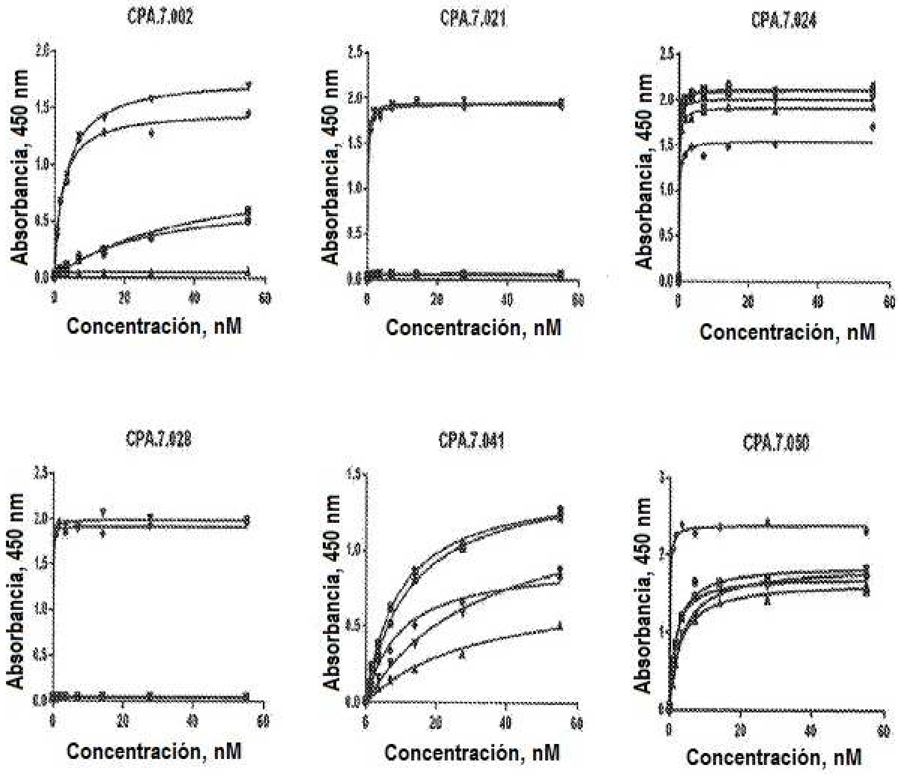


Figura 102

mAb	Cyno reactividad cruzada	Contenedor de epitopo	Grupo de epitopo
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

Figura 103A

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_171_Secuencia_de_ECD_WT_Humana_(sin_SP) SEQ ID NO: 1467

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILRAD

Figura 103B

>PVRIG_NP_076975_desde_21_a_171_Secuencia_de_ECD_WT_Humana_(sin_SP) SEQ ID NO: 1468

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCA
NTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRAD

Figura 103C

>PVRIG_NP_076975_desde_43_a_146_Secuencia_de_Dominio_Ig SEQ ID NO: 1469

EVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEA

Figura 103D

>PVRIG_Variante_de_División_P6 SEQ ID NO: 1470

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCA
NTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHR

Figura 103E

>PVRIG_Variante_de_División_P6 SEQ ID NO: 1471

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCA
NTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSVPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFDCGYLLHLLCRQKHRPAPRLQPSHTSS

Figura 103F

>PVRIG_Variante_de_División_P4 SEQ ID NO: 1472

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRWLSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQA
SQAALHVPYATINTSCRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVR

Figura 103G

>PVRIG_Variante_de_División_P7 SEQ ID NO: 1473

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGLSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATINTSCRPATLDT
AHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVR

Figura 103H

>PVRIG_Variante_de_División_P14 SEQ ID NO: 1474

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGLSVPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFDCGYLLHLLCRQKHRPAPRLQPSHTSS

Figura 103I

>PVRIG_Variante_de_División_P3 SEQ ID NO: 1475

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCA
NTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGGAGARGPGGQGGARELATHLILVSVPRALCPADSCPHSAGRPGRDLGGLRSPPLWLCLPPSSAAPT

Figura 103J

>PVRIG_Variante_de_División_P10 SEQ ID NO: 1476

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGAQISPRGPKIGGPPCPRPGPAGKPRAASLSSW
KALGPAAPAPTPPSAASLRPSQAALHVPYATINTSCRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPD
PRGPRAMEGPLGVR

ES 2 806 800 T3

Figura 103K

>PVRIG_Variante_de_División_P13 SEQ ID NO: 1477

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCA
NTTFCCKFASFPGCSSRPLCHYQHQLPPSYFGHSSPPWGAVLVGVTPHPRCTPAPGPCRLGLHTHPCTWQLCLC

Figura 103L

>PVRIG_Variante_de_División_P3 SEQ ID NO: 1478

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGGAGARGPGGQGGARELATHLILVSVPRALCPADSCPHSAGRPGRDLGGLRSPPLWLCLPPSSAAPT

Figura 103M

>PVRIG_Variante_de_División_P10 SEQ ID NO: 1479

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGAQISPRGPKIGGPPCPRPGPAGKPRAASLSSWKALGPAAPAPTPPSAASLRPS
QAALHVPYATINTSCRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVR

Figura 103N

>PVRIG_Variante_de_División_P13 SEQ ID NO: 1480

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPGCSSRPLCHY
QHQLPPSYFGHSSPPWGAVLVGVTPHPRCTPAPGPCRLGLHTHPCTWQLCLC

Figura 103O

>PVRIG_Variante_de_División_P3_ECD_Única SEQ ID NO: 1481

GAGARGPGGQGGARELATHLILVSVPRALCPADSCPHSAGRPGRDLGGLRSPPLWLCLPPSSAAPT

ES 2 806 800 T3

Figura 103P

>PVRIG_Variante_de_División_P10_ECD_Toda_Única SEQ ID NO: 1482

AQISPRGPKIGGPPCPRPGPAGKPRAASLSSWKALGPAAPAPTPPSAASLRPSQAALHVPYATINTSCRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIP
ARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVR

Figura 103Q

>PVRIG_Variante_de_División_P10_Única_sin_intracelular SEQ ID NO: 1483

AQISPRGPKIGGPPCPRPGPAGKPRAASLSSWKALGPAAPAPTPPSAASLRP

Figura 103R

>PVRIG_Variante_de_División_P13_ECD_Única SEQ ID NO: 1484

GCSSRPLCHYQHQLPPSYFGHSSPPWGAVLVGVTPHPRCTPAPGPCRLGLHTHPCTWQLCLC

Figura 103S

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_169_variación_de_ECD_(sin_SP) SEQ ID NO: 1485

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILR

Figura 103T

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_170_variación_de_ECD_(sin_SP) SEQ ID NO: 1486

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILRA

ES 2 806 800 T3

Figura 103U

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_172_variación_de_ECD_(sin_SP) SEQ ID NO: 1487

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILRADL

Figura 103V

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_173_variación_de_ECD_(sin_SP) SEQ ID NO: 1488

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLA

Figura 103W

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_144_variación_de_Dominio_Ig SEQ ID NO: 1489

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSW

Figura 103X

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_145_variación_de_Dominio_Ig SEQ ID NO: 1490

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWE

Figura 103Y

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_146_variación_de_Dominio_Ig SEQ ID NO: 1491

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEA

Figura 103Z

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_147_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1492

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEAC

Figura 103AA

>PVRIG_NP_076975_desde_41_a_148_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1493

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACG

Figura 103AB

>PVRIG_NP_076975_desde_42_a_144_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1494

PEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSW

Figura 103AC

>PVRIG_NP_076975_desde_42_a_145_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1495

PEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWE

Figura 103AD

>PVRIG_NP_076975_desde_42_a_146_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1496

PEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEA

Figura 103AE

>PVRIG_NP_076975_desde_42_a_147_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1497

PEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEAC

ES 2 806 800 T3

Figura 103AF

>PVRIG_NP_076975_desde_42_a_148_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1498

PEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACG

Figura 103AG

>PVRIG_NP_076975_desde_43_a_144_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1499

EVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSW

Figura 103AH

>PVRIG_NP_076975_desde_43_a_145_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1500

EVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWE

Figura 103AI

>PVRIG_NP_076975_desde_43_a_147_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1501

EVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEAC

Figura 103AJ

>PVRIG_NP_076975_desde_43_a_148_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1502

EVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACG

Figura 103AK

>PVRIG_NP_076975_desde_44_a_144_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1503

VWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSW

ES 2 806 800 T3

Figura 103AL

>PVRIG_NP_076975_desde_44_a_145_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1504

VWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWE

Figura 103AM

>PVRIG_NP_076975_desde_44_a_146_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1505

VWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEA

Figura 103AN

>PVRIG_NP_076975_desde_44_a_147_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1506

VWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEAC

Figura 103AO

>PVRIG_NP_076975_desde_44_a_148_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1507

VWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACG

Figura 103AP

>PVRIG_NP_076975_desde_45_a_144_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1508

WVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSW

Figura 103AQ

>PVRIG_NP_076975_desde_45_a_145_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1509

WVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWE

Figura 103AR

>PVRIG_NP_076975_desde_45_a_146_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1510

WVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEA

Figura 103AS

>PVRIG_NP_076975_desde_45_a_147_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1511

WVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEAC

Figura 103AT

>PVRIG_NP_076975_desde_45_a_148_variación_de_Dominio_de_Ig SEQ ID NO: 1512

WVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACG

Figura 103AU

>PVRIG_XP_006544085_PREDICHA_proteína_transmembrana_tipo-PVRIG_isoforma_X2_[Mus_musculus] SEQ ID NO: 1513

MRTGNTQAAHATNMGQMQTLVLFSTLLTLCVSEASPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETP
NSVSVTLTMGQSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADLVRILGTSGVFLFGFIFILCLRWQQRHWCLSKSQPSLTSTQAQVETQPPHL
ASTHSSFISMENGLYALA

Figura 103AV

>PVRIG_2ª_Met_Ratón_WT SEQ ID NO: 1514

MGQMQTLVLFSTLLTLCVSEASPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKA
RSSLANTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADLVRILGTSGVFLFGFIFILCLRWQQRHWCLSKSQPSLTSTQAQVETQPPHLASTHSSFISMENGLY
ALA

ES 2 806 800 T3

Figura 103AW

>PVRIG_Ratón_WT_ECD_(sin_SP) SEQ ID NO: 1515

SPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRV
ACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQAD

Figura 103AX

>PVRIG_Ratón_WT_ECD_(con_SP) SEQ ID NO: 1516

MGQMQTLVLFSTLLTLCVSEASPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKA
RSSLANTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQAD

Figura 103AY

>PVRIG_HH-1_(ECD_humana_+_IgG1_humana_Fc_mutada_C220S_en_bisagra)_-_sin_SP SEQ ID NO: 1517

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILRADEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 103AZ

>PVRIG_HH-1-1_(ECD_humana_con_mutaciones_C127F_y_C147S_+_IgG1_humana_Fc_mutada_C220S_en_bisagra)_-_sin_SP SEQ ID NO: 1518

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWEASGSL
PPSSDPGLSAPPTPAPILRADEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 806 800 T3

Figura 103BA

>PVRIG_HH-2_(ECD_humano_+_IgG1_humana_Fc_mutada_en_C220S,_C226S,_C229S_de_bisagra)_-_sin_SP SEQ ID NO: 1519

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGS
LPPSSDPGLSAPPTPAPILRADEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 103BB

>PVRIG_HH-2-1_(ECD_humano_con_mutación_C127F_+_IgG1_humana_Fc_mutada_en_C220S,_C226S,
_C229S_de_bisagra_codificada_por_codones_naturales_en_lugar_de_codones_optimizados_para_células_CHO)_-_sin_SP SEQ
ID NO: 1520

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWEACGSL
PPSSDPGLSAPPTPAPILRADEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 103BC

>PVRIG_MM-1_(ECD_de_ratón_+_IgG2a_de_ratón_Fc)_-_sin_SP SEQ ID NO: 1521

SPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRV
ACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR
VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSK
LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Figura 103BD

>PVRIG_MM-1-1_(ECD_de_ratón_+_IgG2a_de_ratón_Fc_con_3_C_mutados_a_S_en_bisagra)_-_sin_SP SEQ ID NO: 1522

SPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRV
ACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADEPRGPTIKPSPPSKSPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR
VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSK
LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Figura 103BE

>Fc_humana_(IgG1) SEQ ID NO: 1523

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Figura 103BF

>Fc_human_(IgG1)_C220S SEQ ID NO: 1524

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Figura 103BG

>Fc_humana_(IgG1)_con_las_mutaciones_C220S_(en_bisagra)_y_N297A SEQ ID NO: 1525

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Figura 103BH

>Fc_humana_(IgG1)_sin_bisagra SEQ ID NO: 1526

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 103BI

>Fc_de_ratón_(IgG2a) SEQ ID NO: 1527

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN
NKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH
NHHTTKSFSRTPGK

Figura 103BJ

>Fc_de_ratón_(IgG2a)_Fc_con_la_mutación_N297A SEQ ID NO: 1528

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYASTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN
NKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH
NHHTTKSFSRTPGK

Figura 103BK

>Fc_de_ratón_(IgG2a)_sin_bisagra SEQ ID NO: 1529

APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK
GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Figura 103BL

>Fc_humana_(IgG1)_con_las_mutaciones_C220S_C226S_C229S_(en_bisagra) SEQ ID NO: 1530

EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Figura 103BM

>PVRIG_CEBADOR_200-554_m15029_F SEQ ID NO: 1531

CCACCAACCTCTCGTCTTTC

Figura 103BN

>PVRIG_CEBADOR_200-553_m15029_R SEQ ID NO: 1532

TCATGCCAGAGCATACAG

Figura 103BO

>PVRIG_CEBADOR_200-571_m15029_F SEQ ID NO: 1533

CAGTGCCTCTAACTGCTGAC

Figura 103BP

>PVRIG_CEBADOR_200-572_m15029_R SEQ ID NO: 1534

TCACTGTTACCAGGGAGATGAG

ES 2 806 800 T3

Figura 103BQ

>PVRIG_CEBADOR_200-549_m15029_F SEQ ID NO: 1535

CACAGGCTGCCCATGCAAC

Figura 103BR

>PVRIG_CEBADOR_200-551_m15029_R SEQ ID NO: 1536

TGCCTGGGTGCTAGTGAGAG

Figura 103BS

>PVRIG_CEBADOR_200-554_m15029_F SEQ ID NO: 1537

CCACCAACCTCTCGTCTTTC

Figura 103BT

>PVRIG_CEBADOR_200-546_m15029_R SEQ ID NO: 1538

GACCCTGTTACCTGTCATTG

Figura 103BU

>PVRIG_Proteina_flag SEQ ID NO: 1539

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCA
NTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATINTS
CRPATLDTAHPHGGPSWWASLPTHAAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPPHTGPGLTLFPDPRGPRAMEGPLGVRDYKDDDDDK

Figura 103BV

>PVRIG_Ratón_Primera_Metionina_péptido_señal-Flag-ECD SEQ ID NO: 1540

MRTGNTQAAHATNMGQMQTLVLFSTLLTLCVSEADYKDDDDKSPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPAR
QAHWETPNSVSVTLTMGQSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADLVRILGTSGVFLFGFIFILCLRWQQRHWCLSKSQPSLTSTQAQ
VETQPPHLASTHSSFISMENGLYALA

Figura 103BW

>PVRIG_Ratón_Tercera_Metionina_sin_marcar SEQ ID NO: 1541

MQTLVLFSTLLTLCVSEASPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKARSSLA
NTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADLVRILGTSGVFLFGFIFILCLRWQQRHWCLSKSQPSLTSTQAQVETQPPHLASTHSSFISMENGLYALA

Figura 103BX

>PVRIG_Ratón_Tercera_Metionina_péptido_señal-Flag-ECD SEQ ID NO: 1542

MQTLVLFSTLLTLCVSEADYKDDDDKSPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMG
QSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQADLVRILGTSGVFLFGFIFILCLRWQQRHWCLSKSQPSLTSTQAQVETQPPHLASTHSSFISME
NGLYALA

ES 2 806 800 T3