

ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS ANTI-VISTA

SOLICITUD(ES) RELACIONADA(S)

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 61/920.695, presentada el 24 de diciembre de 2013 y de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 62/085.086, presentada el 26 de noviembre de 2014. Las enseñanzas de las solicitudes anteriores se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La expresión de reguladores del punto de control inmune negativo por células cancerosas o células inmunes en el microambiente tumoral puede suprimir la respuesta inmune del hospedador frente al tumor. Para combatir eficazmente el cáncer, es deseable bloquear la supresión mediada por tumor de la respuesta inmune del hospedador. Por consiguiente, existe una necesidad de nuevos y eficaces agentes terapéuticos que inhiban los reguladores del punto de control inmune negativo en el microambiente tumoral que suprime las respuestas inmunes antitumorales.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que comprenden una región de unión a antígeno que se une al dominio V de la Ig supresora de la activación de linfocitos T (VISTA). VISTA es un regulador negativo del punto de control que suprime negativamente las respuestas inmunes. Véase Wang *et al.*, "VISTA un novedoso ligando de la superfamilia de las Ig de ratón que regula negativamente las respuestas de los linfocitos T", *J. Exp. Med.* 208(3):577-92 (2011). Se expresa en neutrófilos humanos normales, monocitos y subconjuntos de linfocitos T. Además, las células de macaco expresan VISTA de un modo similar a las células humanas normales. VISTA se expresa también en las células de la sangre periférica de pacientes de cáncer.

La unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo a VISTA modula o potencia la respuesta inmune. El fragmento de anticuerpo puede incluir, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, scFv. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una región constante de anticuerpos. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a VISTA, que se expresa en una célula hematopoyética, por ejemplo, una célula mieloide

y/o un linfocito, un monocito o un neutrófilo, un linfocito T, un linfocito citolítico natural (NK), un linfocito T citolítico natural (NKT), una célula tumoral, y/o en el microambiente tumoral (TME). El microambiente tumoral es el ambiente celular del tumor. Este puede incluir las células inmunes que lo rodean, fibroblastos, vasos sanguíneos, otras células, moléculas de señalización, y la matriz extracelular.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y una o más CDR de la cadena ligera, incluyendo una o más CDR (por ejemplo, las tres CDR de la cadena pesada, las 3 CDR de la cadena ligera o las 6 CDR de cualquiera de los anticuerpos anti-VISTA descritos en el presente documento), incluyendo los anticuerpos diseñados VSTB112 (S2) VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47). En algunas realizaciones, los anticuerpos o sus fragmentos se seleccionan entre el grupo que consiste en VSTB112, VSTB95, VSTB116, VSTB50, VSTB53 y VSTB60. En una realización, el anticuerpo o fragmento comprende una o más de las CDR de la cadena pesada y una o más CDR de la cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos anti-VISTA descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender además al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos anti-VISTA descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende al menos una cadena pesada que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada, y/o al menos una cadena ligera que comprende la secuencia de la región variable de la cadena ligera. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región marco humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo completo. En algunas realizaciones, el fragmento es un miembro de unión anti-VISTA. En algunas realizaciones, las CDR de la cadena pesada del anticuerpo se representan en las SEC ID N°: 1, 2, y 3 y las CDR de la cadena ligera se representan en las SEC ID N°: 4, 5, y 6. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se representan en las SEC ID N°: 7 y 8, respectivamente.

La invención abarca también anticuerpos anti-VISTA que son sustancialmente similares a los anticuerpos descritos en el presente

documento. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo o fragmento comprende un dominio VH de anticuerpos que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la SEC ID N°: 1 una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 2 y una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 3, y que comprende además un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la SEC ID NO: 4 una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 5 y una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 6.

La invención también se refiere a anticuerpos anti-VISTA que inhiben competitivamente, o compiten por la unión a, los anticuerpos anti-VISTA descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-VISTA son parte de un conjugado, por ejemplo, un conjugado que comprende una molécula citotóxica u otro agente descrito en el presente documento. Dichas moléculas se conocen generalmente en la técnica.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En algunas realizaciones, El anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región constante humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento es específico para un epítipo de VISTA, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 9 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un epítipo de VISTA con una afinidad de al menos 1×10^{-7} litro/mol, por ejemplo, al menos 1×10^{-8} litros/mol, por ejemplo, al menos 1×10^{-9} litro/mol.

En algunas realizaciones, la modulación de la respuesta inmune comprende un aumento en leucocitos CD45+, linfocitos T CD4+, y/o linfocitos T CD8+. En algunas realizaciones, la modulación de la respuesta inmunitaria comprende un aumento en la producción de citocinas (por ejemplo, de linfocitos T) (por ejemplo, $\text{IFN}\gamma$, IL-10, $\text{TNF}\alpha$, IL-17), respuesta potenciada de los linfocitos T, y/o modula la expresión de Foxp3.

La presente invención se refiere también a composiciones que

comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-VISTA) y un portador, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede comprender un antagonista de VISTA que comprende un anticuerpo o un
5 fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA, y una vacuna (tal como una vacuna de vector vírico, vacuna bacteriana, vacuna de ADN, vacuna de ARN, vacuna peptídica). En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a VISTA modula o potencia una
10 respuesta inmune.

La invención se refiere también a métodos para tratar o prevenir el cáncer que comprenden administrar a un individuo (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un animal no humano) que lo necesita, una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o
15 composición descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a VISTA, modulando o potenciando por tanto una respuesta inmunógena al cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es una leucemia, linfoma, síndrome mielodisplásico y/o mieloma. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser
20 cualquier clase o tipo de leucemia, incluyendo una leucemia linfocítica o una leucemia mielógena, tales como, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (mielógena) (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia de células pilosas, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular extendida, o
25 leucemia de linfocitos T adultos. En algunas realizaciones, el linfoma es un linfoma histocítico, y en algunas realizaciones, el cáncer es un mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido, por ejemplo, un melanoma, o un cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC)).
30 Algunos métodos de tratamiento comprenden además administrar una vacuna (tal como una vacuna de vector vírico, vacuna bacteriana, vacuna basada en células, vacuna de ADN, vacuna de ARN, vacuna peptídica, o vacuna de proteínas). La invención se refiere también a un método para suprimir el crecimiento tumoral en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho
35 método administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o composición

eficaces descritas en el presente documento.

La composición, anticuerpo o fragmento u otro agente farmacéutico (por ejemplo, una vacuna) se puede administrar mediante cualquier medio parenteral o no parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), por vía
5 subcutánea (SC) o por vía oral (PO).

En algunas realizaciones, la composición, anticuerpo o fragmento se administra trimestralmente, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En algunas realizaciones, se administran simultáneamente otros agentes farmacéuticos o
10 terapéuticos, antes, durante o después de los anticuerpos, fragmentos y composiciones descritas en el presente documento. El agente administrado simultáneamente se puede administrar mediante la misma ruta que el anticuerpo, fragmento o composición, o mediante una ruta diferente.

La invención incluye también métodos para preparar los anticuerpos, fragmentos o composiciones, por ejemplo, un método para producir un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento, que comprende cultivar células hospedadoras en condiciones para la producción de dicho anticuerpo. El método puede comprender además aislar el anticuerpo. La invención se refiere también a ácidos nucleicos, *por ejemplo*, ácidos nucleicos
15 aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican los anticuerpos y fragmentos, vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos, *por ejemplo*, unidos operativamente a un promotor y células hospedadoras transformadas con dicho vector de expresión.

La invención se refiere también a kits y a artículos de fabricación que comprenden una composición que comprende un anticuerpo anti-VISTA y un
25 recipiente, y que comprende además un prospecto o etiqueta que indica que la composición se puede usar para tratar el cáncer.

La invención proporciona también un anticuerpo aislado o su fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno que se une al dominio V de la Ig supresora de la activación de linfocitos T (VISTA), donde el anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:25, una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:26 y una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente
30 similar a la SEC ID N°: 27, y que comprende además un dominio VL de

anticuerpo que comprende CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 29 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:30, En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una o más regiones humanizadas o marco humanas. En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la SEC ID N°:37 y/o un dominio VL de anticuerpo que comprende la SEC ID N°: 44. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada (por ejemplo, una región constante de la cadena pesada humana) y/o una región constante de la cadena ligera (por ejemplo, una región constante de la cadena ligera humana, tal como la región constante de la cadena ligera presente en la SEC ID N°:56 Preferentemente, la región constante de la cadena pesada) es una región constante de la cadena pesada de IgG1(por ejemplo, la región constante de la cadena pesada de IgG1 presente en la SEC ID N°:61). En una realización particular, la región constante de la cadena pesada de IgG1 se ha modificado para potenciar la resistencia a la proteasa del anticuerpo. Un ejemplo de una región constante de la cadena pesada de IgG1 que se ha modificado para potenciar la resistencia a la proteasa es la región constante de la cadena pesada de IgG1 presente en la SEC ID N°: 60. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEC ID N° 60 y una cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 56 o una cadena pesada que comprende la SEC ID N° 61 y una cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 56. En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se expresa en una célula que es deficiente en las enzimas de fucosilación (por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) que es deficiente en enzimas de fucosilación).

La invención se refiere también a una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25, una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:26 y una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 27, y que comprende además un dominio VL de anticuerpo que comprende CDR1 de

VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 29 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 30, y un portador, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptables.

5 En otra realización, la invención se refiere también a un método para tratar el cáncer en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un dominio V de la Ig supresora de la activación de los linfocitos T (VISTA) donde el anticuerpo comprende un dominio VH de
10 anticuerpo que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:25, una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:26 y una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 27, y que comprende además un dominio VL de anticuerpo que comprende CDR1 de VL
15 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 29 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:30, En una realización particular, el cáncer es un cáncer de pulmón. En una realización adicional, el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC). En
20 algunas realizaciones, el método comprende además administrar un segundo tratamiento canceroso (por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica, terapia inmunomoduladora, y sus combinaciones).

La invención proporciona también un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno que se une al
25 dominio V de la Ig supresora de la activación de linfocitos T (VISTA), donde el anticuerpo se une a un epítipo conformacional en VISTA (por ejemplo, VISTA humano). En algunas realizaciones, el epítipo conformacional comprende, o está presente en, los restos 103-111 (NLTLDSGL (SEC ID NO:62)) y 136-146 (VQTGKDAPSNC (SEQ ID NO:63)) de VISTA humano (SEC ID NO:46). En
30 otra realización, el epítipo conformacional comprende, o está presente en, los restos 24-36 (LLGPVDKGHDVTF (SEC ID N°:64)), 54-65 (RRPIRNLTFQDL (SEQ ID NO:65) y 100-102 (TMR) de VISTA humano (SEC ID NO:46). En otra realización adicional, el epítipo conformacional comprende restos de aminoácidos en el bucle FG de VISTA humano (SEC ID N°:46).

35 Además, la invención se refiere a un método para potenciar una

respuesta inmune en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al dominio V de la Ig supresora de la activación de los linfocitos T (VISTA), o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA, potenciando por tanto una respuesta inmune al cáncer. En una realización particular, la respuesta inmune es una respuesta inmune antitumoral.

En otra realización, la invención proporciona un método para estimular una respuesta biológica en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al dominio V de la Ig supresora de la activación de los linfocitos T (VISTA), o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA, potenciando por tanto una respuesta inmune al cáncer. Los ejemplos de respuestas biológicas incluyen la activación de monocitos; inducción de la proliferación de linfocitos T y secreción de las citocinas; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan VISTA; y una fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) de células que expresan VISTA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o de solicitud de patente con dibujo(s) de color tras la solicitud de pago de la cuota necesaria.

Figura 1A-1C: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en AML de TF1. La expresión de la proteína VISTA en células AML de TF1 mediante citometría de flujo se muestra en la línea celular AML de TF1.

Figura 2A-2E: Gráficos que muestran estrategias de tinción y de clasificación para la identificación de subconjuntos mieloides y linfoides humanos.

Figura 3A-3G: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en subconjuntos mieloides y linfoides humanos de un donante normal sano.

Figura 4: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en subconjuntos mieloides y linfoides humanos a través de donantes normales sanos.

Figura 5A-5B, Gráficos que muestran estrategias de tinción y de clasificación para la identificación de la expresión de VISTA en monocitos y

macrófagos humanos.

Figura 6A-6C: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en monocitos y macrófagos humanos.

Figura 7A-7E: Gráficos que muestran estrategias de tinción y de
5 clasificación para la identificación de la expresión de VISTA en subconjuntos de linfocitos T y NK humanos.

Figura 8A-8G: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en subconjuntos de linfocitos T y NK humanos de un donante normal sano.

Figura 9: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en subconjuntos
10 de linfocitos T y NK humanos a través de múltiples donantes sanos.

Figura 10A-10D: Gráficos que muestran estrategias de tinción y de clasificación para la identificación de la expresión de VISTA en subconjuntos de células dendríticas humanas.

Figura 11A-11C: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en
15 subconjuntos de células dendríticas humanas y basófilos de un donante normal sano.

Figura 12: Gráficos que muestran la expresión de VISTA en subconjuntos de células dendríticas humanas y basófilos a través de múltiples donantes normales sanos.

Figura 13A-13D: Análisis de la expresión de VISTA en células de la
20 sangre periféricas humanas sanas. Perfil de la expresión de VISTA en células de la sangre periférica humana sana que utilizan análisis de citometría de flujo multicolor: Muestras de sangre completa de 2 diferentes individuos se analizaron para la expresión de VISTA en los (Figura 13A) monocitos
25 $SSC^{lo}CD11b^{hi}CD14^{hi}CD16^{-ve}CD33^{+ve}HLA-DR^{+ve}CD19^{-ve}$ (Figura 13B) neutrófilos ($SSC^{hi}CD177^{+}CD11b^{hi}CD14^{lo}CD16^{+ve}CD33^{+ve}HLA-DR^{-ve}CD19^{-ve}$). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica usando un gradiente de Ficoll para el análisis de (Figura 13C) linfocitos T $CD4^{+}$ ($CD3^{+ve}CD4^{+ve}$), y linfocitos T $CD8^{+}$ (Figura 13D) ($CD3^{+ve}CD8^{+ve}$).

Figura 14A-14C: Análisis de la expresión de VISTA en células de la
30 sangre periférica de un paciente con cáncer de pulmón y un donante control sano. Perfil de la expresión de VISTA en células de la sangre periférica de paciente con cáncer usando el análisis de citometría de flujo multicolor: Se muestra la gráfica FACS representativa (Figura 14A) de un individuo. Se
35 aislaron células mononucleares de sangre periférica mediante Ficoll y se

analizaron para la expresión de VISTA en (Figura 14B) monocitos (CD14+ CD11b+ CD33+ HLADR+ CD15-) y (Figura 14C) células supresoras derivadas de mieloide (CD14- CD11b+ CD33-HLADR-CD15+ CD16+).

Figura 15A-1C: Perfil de la expresión de VISTA en células de la sangre periférica de un paciente con cáncer de colon, usando el análisis de citometría de flujo multicolor: Se muestra la gráfica FACS representativa (Figura 15A) de un individuo. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica mediante Ficoll y se analizaron para la expresión de VISTA en (Figura 15B) monocitos (CD14+ CD11b+ CD33+ HLADR+ CD15-) y (Figura 14C) células supresoras derivadas de mieloide (CD14- CD11b+ CD33-HLADR-CD15+ CD16+).

Figura 16A-16D: Perfil de la expresión de VISTA en células de sangre periférica de macaco utilizando análisis de citometría de flujo multicolor: Se analizó la sangre completa de 4 monos diferentes para la expresión de VISTA en (Figura 16A) monocitos ($SSC^{lo}CD11b^{hi}CD14^{hi}HLA-DR^{hi}CD16^{-ve}CD19^{-ve}$ y (Figura 16B) neutrófilos $CD11b^{hi}CD14^{lo}HLA-DR^{-ve}CD16^{-ve}CD19^{-ve}$. Se aislaron mononucleares de sangre periférica de tres monos utilizando un gradiente de Ficoll para el análisis de (Figura 16C) linfocitos T CD4+ ($TCR\alpha/\beta^{+ve}CD4^{+ve}$) y (Figura 16D) linfocitos T CD8+ ($TCR\alpha/\beta^{+ve}CD8^{+ve}$).

Figura 17: Gráfico que muestra valores de expresión absolutos del ARN de VISTA en líneas de células Heme.

Figura 18: Células A20 de ratón se transfectaron de forma estable tanto con GFP como con VISTA humano. Se incubaron con el péptido OVA y con linfocitos T DO11.10. Se midió la expresión de CD25 por los linfocitos T 24 horas después que había comenzado la incubación. Las células A20-huVISTA suprimen la expresión de CD25 por los linfocitos T, pero esta lectura está significativamente restaurada por la incubación con VSTB95.

Figura 19A-19F: Gráficas que muestran los resultados ELISA de VISTA humano.

Figura 20A-20F: Resultados FACS de VISTA humano, que muestran la unión de los anticuerpos anti-VISTA a las células que expresan VISTA HUMANO.

Figura 21A-21D: El estudio de dilución de 6 candidatos de anticuerpos anti-VISTA en la reacción de los linfocitos mixtos de 30 $\mu\text{g/ml}$ a 0,0 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 22A-22B; Estudios de dilución de 6 candidatos anticuerpos anti-VISTA en el ensayo SEB (recuentos CPM individuales y concentraciones de

IFN-g) de 30 µg/ml a 0,0 µg/ml.

Figura 23: gráfica de sensograma utilizando un anticuerpo VSTB85 anti-VISTA revestido en un chip Proteon SPR y de la proteína VISTA con los competidores indicados avanzando sobre el chip (competidores relacionados en la Tabla 16).

Figura 24: Diseño experimental para un modelo de tumor MB49 de vejiga de murino

Figura 25A-25B; Crecimiento de tumor MB49 en ratones C57Bl/6 hembras. Los gráficos ilustran el crecimiento tumoral en ratones individuales tratados con anticuerpo VISTA anti ratón (Figura 25B) o IgG control (Figura 25A).

Figura 26: Secuencia de aminoácidos de VISTA humano (SEQ ID N°: 46).

Figura 27: Múltiple alineación de secuencias de ortólogos VISTA

Figura 28: Regiones de VISTA humano unido mediante anticuerpos VSTB50 y VSTB60 (parte superior) o anticuerpos VSTB95 y VSTB112 (parte inferior), tal como se ha determinado por HDX

Figura 29: Epítipo de VISTA unido mediante VSTB112. (Parte superior) se muestra en forma de animación con las hebras marcadas. Residuos que tienen al menos un átomo en 5 Å de VSTB112 en el complejo son de color azul. Las esferas azul y naranja resaltan una rotura de cadena, y las esferas cian y verde marcan los términos N y C de la estructura de VISTA, respectivamente. (Parte inferior) Secuencia de la construcción de VISTA utilizada en la determinación de la estructura. Los círculos por debajo de la secuencia se usan para indicar que hacen solo contactos en la cadena principal con VSTB112. Los triángulos indican un contacto de la cadena secundaria, y los cuadrados indican el contacto de la cadena secundaria que da como resultado tanto un enlace de hidrógeno como una interacción de puente salino que se calculó mediante PISA. Se colorearon las muestras para indicar que la CDR que tenía el mayor número de átomos contactados por el resto administrado con colores CDR definidos en la Figura 59. Los elementos estructurales secundarios son como se ha definido en el programa MOE con flechas de color amarillo que representan hebras β y rectángulos rojos que indican las hélices α.

Figura 30: Paratopo VSTB112 (Parte superior) se muestra el antígeno

VISTA en ilustración VSTB112 en 5 angstrom (Å) de VISTA se muestra en la superficie con los colores usados para diseñar la identidad de CDR tal como se especifica en la secuencia siguiente. Los restos marco que entraron en contacto adyacentes a la CDR se colorearon de manera similar a la CDR complementaria (Parte inferior) Secuencia de la región Fv de VSTB112

5 Especificidad de los antecedentes coloreados de las CDR de acuerdo con las definiciones de Kabat. Los círculos por debajo de la secuencia se usan para indicar que hacen solo contactos en la cadena principal con VISTA.. Los triángulos indican un contacto de la cadena secundaria, y los cuadrados indican

10 el contacto de la cadena secundaria que da como resultado tanto un enlace de hidrógeno como una interacción de puente salino que se calculó mediante PISA.

Figura 31: Comparación de las regiones de epítopos identificadas mediante cristalografía e intercambio de hidrógeno de deuterio (HDX).

15 Secuencia de la construcción de VISTA utilizada en la determinación de la estructura. Los círculos por debajo de la secuencia se usan para indicar que hacen solo contactos en la cadena principal con VSTB112. Los triángulos indican un contacto de la cadena secundaria, y los cuadrados indican el contacto de la cadena secundaria que da como resultado tanto un enlace de

20 hidrógeno como una interacción de puente salino que se calculó mediante PISA.

Figura 32: Activación de CD14+ monocitos en PBMC completa mediante VSTB174 (derivada de VSTB112). En cada parte del experimento, se incubaron las células con PBS, anticuerpo control de IgG1, o VSTB174 a 1, 0,1

25 o 0,01 ug/ml. El panel izquierdo muestra MFI de CD80: el panel derecho muestra MFI de HLA-DR (se muestran los resultados representativos con dos donantes).

Figura 33: la gráfica muestra la actividad de ADCC de VSTB174 dirigida contra las células K562-VISTA.

30 Figura 34: la gráfica muestra la actividad de ADCP de VSTB174 dirigida contra las células K562-VISTA. Ambos anticuerpos representados gráficamente tienen el mismo Fab, pero VSTB174 tiene una IgG1 Fc y VSTB140 tiene una IgG2 silenciosa de Fc.

Figura 35: La gráfica muestra la fagocitosis mediada por los mAb

35 VSTB174, VSTB149 o VSTB140 frente a K562-VISTA. Se ensayó cada mAb

con 7 dosis de log medios, que variaban de 0,0008 $\mu\text{g/ml}$ a 0,56 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 36: La gráfica muestra la fagocitosis mediada por los mAb VSTB174, VSTB149 o VSTB140 frente a la línea celular K562 de mieloma. Se ensayó cada mAb con 7 dosis de log medios, que variaban de 0,0008 $\mu\text{g/ml}$ a 0,56 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 37: Estudio de eficacia del tumor MB49 evaluando VSTB123 1 5, 7,5, y 10 mg/kg en ratones VISTA-KI hembras. Los volúmenes tumorales fueron aproximadamente de 50 mm^3 cuando comenzó la dosificación en el día 6 después del implante. VSTB123 es el VSTB112 Fab injertado en una estructura de Fc de ratón y se une a VISTA humano en VISTA-KI de ratón.

Figura 38: El gráfico muestra que células CD14+ que expresaban niveles altos/intermedios de VISTA se encuentran en 13/13 muestras de cáncer de pulmón, así como en tejido pulmonar distante y en la sangre periférica de pacientes.

Figura 39: tinción de IHC para VISTA en cáncer de pulmón utilizando GG8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Sigue una descripción de las realizaciones del ejemplo de la invención.

La presente invención se refiere a anticuerpos para un novedoso ligando de la familia de las inmunoglobulinas designado dominio V de la inmunoglobulina supresora de la activación de linfocitos T (VISTA) (GenBank: JN602184) (Wang et al., 2010, 2011). VISTA comparte la homología con PD-L1 pero muestra un patrón de expresión único que está restringido a el compartimento hematopoyético. Específicamente, VISTA está constitutivamente y muy expresado en células mieloides CD11b^{high}, y se expresa a niveles más bajos en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ el homólogo humano comparte aproximadamente un 85 % de homología con VISTA de murino y tiene modelos de expresión similares (Lines et al, Cancer Research 74:1924; 2014). VISTA expresado en células que expresan antígeno (APC) suprime la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ T y la producción de citocinas mediante un receptor análogo independiente de PD-1. En un modelo de enfermedad EAE pasivo (encefalomielitis autoinmune experimental) un anticuerpo monoclonal específico de VISTA potenció las respuestas inmunes dependientes de los linfocitos T y exacerbó la enfermedad. La expresión en exceso de VISTA en células tumorales aumentó la inmunidad protectora

antitumoral en hospedadores que expresaban tumores. Los estudios de VISTA humano confirmaron su función supresora en linfocitos T humanos (Lines et al Cancer Research 74:1924, 2014 Los estudios de Flies et al. identificaron también VISTA (denominado PD-1H) como una potente molécula
5 inmunosupresora (Flies et al., 2011). VISTA se describe en detalle en la solicitud publicada de los Estados Unidos U.S. 20130177557 A1 y en las patentes de los Estados Unidos N° 7.919.585 y 8.236.304, que se han incorporado por referencia en su totalidad en el presente documento.

VISTA es un novedoso regulador del punto de control central negativo
10 que suprime las respuestas inmunes. Tal como se describe en el Ejemplo 12 en el presente documento, el tratamiento con un anticuerpo monoclonal específico de VISTA en modelos tumorales de murino ha mostrado invertir el carácter supresor del microambiente inmune del tumor y potenciar la inmunidad antitumoral protectora, de esta manera, demostrando el potencial de un
15 anticuerpo monoclonal VISTA como un novedoso agente terapéutico para la inmunoterapia del cáncer.

ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS DE LA PRESENTE INVENCION

El término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos quiméricos, anticuerpos
20 humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), así como fragmentos, regiones o derivados de las mismas, proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tales como, pero sin limitarse a, escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes Los anticuerpos anti-VISTA de la presente invención son capaces de unir porciones de VISTA que
25 modulan, regulan, o potencian una respuesta inmune. En algunas realizaciones, los anticuerpos inhiben competitivamente uno o más de los anticuerpos anti-VISTA descritos en el presente documento. Se conocen en la materia métodos para determinar si dos o más anticuerpos compiten por la unión a la misma diana. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de unión
30 competitivo para determinar si un anticuerpo bloquea la unión de otro anticuerpo a la diana. Normalmente, un ensayo de unión competitivo implica el uso de un antígeno diana purificado (*por ejemplo*, PD-1) unido tanto como sustrato sólido como a células, una molécula de unión a ensayo no marcada, y una molécula de unión a referencia marcada. La inhibición competitiva se mide
35 determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en

presencia de la molécula de unión a ensayo. Usualmente, la molécula de unión a ensayo está presente en exceso. Normalmente, cuando una molécula de unión competitiva está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un
5 50 %-55 %. 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, o más. En algunas realizaciones, la inhibición competitiva se determina usando un ensayo ELISA de inhibición competitiva.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados
10 con un antígeno. Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos de antígenos, cuya población contiene sitios de unión a epítopos sustancialmente similares. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Kohler y Milstein, *Nature*,
15 256:495-497 (1975); patente de los Estados Unidos N° 4.376.110; Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); y Harlow y Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley
20 Interscience, N.Y., (1992, 1993), los contenidos de todos los cuales se han incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquiera de sus subclases. Un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede cultivar *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.
25

La invención abarca también fragmentos de la digestión, las porciones especificadas y sus variantes, que incluyen anticuerpos miméticos o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o la función de un anticuerpo o fragmento especificado o su porción, incluyendo anticuerpos
30 monocatenarios y sus fragmentos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígeno que se unen a una proteína VISTA de mamífero. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a VISTA o a sus porciones, incluyendo, pero sin limitarse a fragmentos Fab, (por ejemplo, mediante la digestión de la papaína), Fab' (por ejemplo, mediante la digestión
35 con pepsina y una reducción parcial) y F(ab')₂ (por ejemplo, mediante la

digestión con pepsina), facb (por ejemplo, mediante la digestión con plasmina) pFc' (por ejemplo, mediante la digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, mediante la digestión con pepsina), la reducción parcial y la reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular), están abarcados por la invención (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, anteriormente citado). Los fragmentos de anticuerpos de la presente invención incluyen también los discutidos y descritos en Aaron L. Nelson, mAbs 2:1, 77-83 (Enero/Febrero 2010), los contenidos de los cuales se incorporan por referencia en su totalidad.

Se pueden producir dichos fragmentos, por ejemplo, mediante técnicas de escisión enzimática sintética o recombinante, como se conoce en la técnica y/o como se describen en el presente documento. Se pueden producir también anticuerpos en una variedad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los cuales se han introducido uno o más codones de detención en la dirección 5' del sitio de detención natural. Por ejemplo, se puede diseñar una combinación de genes que codifica una porción de la cadena pesada de F(ab')₂ para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos se pueden unir juntas químicamente mediante técnicas convencionales, o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, o porción de la misma (por ejemplo, regiones variables, CDR) tiene aproximadamente un 70-100 % de identidad (por ejemplo, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier intervalo o valor de los anteriores) con la secuencia de aminoácidos de la cadena de la secuencia variable correspondiente descrita en la anterior. Preferentemente, un 70-100 % de identidad de aminoácidos (por ejemplo, 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier intervalo o valor de los anteriores) se determina usando un algoritmo informático adecuado, como es bien conocido en la técnica.

Se proporcionan en el presente documento ejemplos de secuencias de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera.

Los anticuerpos de la presente invención, o sus variantes especificadas, pueden comprender cualquier número de restos de aminoácidos contiguos a

partir de un anticuerpo de la presente invención, donde este número se selecciona entre el grupo de enteros que consisten en entre 10-100 % del número de restos contiguos en un anticuerpo anti-TNF. De manera opcional, Esta subsecuencia de aminoácidos contiguos es de al menos
5 aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 o más aminoácidos de longitud o cualquier intervalo o valor de los anteriores. Además, el número de dichas subsecuencias puede ser cualquier entero seleccionado entre el grupo que consiste en entre 1 a 20, tal como al menos 2, 3, 4 ó 5.

10 Como los expertos apreciarán, la presente invención incluye al menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos un 20 %, 30 % o 40 %, y preferente de al menos un 50 %, 60 %, o 70 %, incluso de forma más preferente de al menos un 80 %, 90 %, o 95 %-100 % de la del anticuerpo
15 natural (no sintético), endógeno o relacionado y conocido. Los métodos para evaluar y cuantificar medidas de la actividad enzimática y la especificidad del sustrato son bien conocidos de los expertos en la materia son bien conocidos de los expertos en la técnica.

La similitud sustancial se refiere a un compuesto que tiene al menos un
20 85 % (por ejemplo, al menos un 95 %) de identidad y al menos un 85 % (por ejemplo, al menos un 95 %) de la actividad del anticuerpo nativo (no sintético), endógeno o relacionado y conocido.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína
25 (por ejemplo, CDR, marco, dominios CL CH (por ejemplo, CH1, CH2, CH3), bisagra, (VL, VH) es sustancialmente no inmunógena en seres humanos, con solo cambios o variaciones menores der secuencias. De manera similar, se diseñaron anticuerpos de primates (monos, babuinos, chimpancés, y similares), roedores (ratones, ratas, y similares) y se diseñaron otros anticuerpos
30 específicos de especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos pueden incluir cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones retienen o reducen opcional y preferentemente la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies con respecto a anticuerpos no modificados. De esta manera, un anticuerpo humano es distinto
35 de un anticuerpo quimérico o humanizado. Nótese que el anticuerpo humano

puede estar producido por un animal no humano o una célula procariota o eucariota que es capaz de expresar funcionalmente los genes recolocados de la inmunoglobulina humana (por ejemplo, la cadena pesada y/o la cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido enlazador que no se une en los anticuerpos humanos naturales. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho restos de glicina u otros restos de aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos enlazadores son de origen humano.

También pueden usarse anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares que son monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En este caso, una de las especificidades de unión es para al menos una proteína VISTA, la otra es para cualquier antígeno diferente. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se puede basar en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, Nature 305:537 (1983)). Véase también el documento WO 93/08829, patentes de los Estados Unidos N° 6.210.668, 6.193.967, 6.132.992, 6.106.833, 6.060.285, 6.037.453, 6.010.902, 5.989.530, 5.959.084, 5.959.083, 5.932.448, 5.833.985, 5.821.333, 5.807.706, 5.643.759, 5.601.819, 5.582.996, 5.496.549, 4.676.980, documento WO 91/00360, documento WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento a modo de referencia.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico dirigido a VISTA y a una segunda proteína diana (por ejemplo, una proteína inmune del punto de control). Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos incluyen un anticuerpo biespecífico dirigido a VISTA y a PD-L1 y un anticuerpo biespecífico dirigido a VISTA y a PD-L2.

Pueden provocarse anticuerpos humanos que son específicos para proteínas de VISTA humanas o fragmentos de las mismas contra un antígeno inmunogénico adecuado, tal como la proteína VISTA o una porción de las

mismas (incluyendo moléculas sintéticas, tales como péptidos sintéticos).

Se pueden provocar de manera general otros anticuerpos de mamíferos específicos o generales. Se puede llevar a cabo la preparación de antígenos inmunógenos y la producción de anticuerpos monoclonales utilizando cualquier
5 técnica adecuada.

Por ejemplo, se produce un hibridoma fusionando una línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero sin limitarse a, Sp2/0, Sp2/0-AG14 NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1,
10 JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIIWA, NEURO 2A, o similares, o heteromielomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o fusión de células derivadas de las anteriores, u otra línea celular adecuada como se conoce en la técnica, Véase, por ejemplo, www.atcc.org, con células productoras de anticuerpos. las células productoras
15 de anticuerpos pueden incluir esplenocitos aislados o clonados, células de la sangre periférica, linfocitos células de las amígdalas, u otras células inmunes (por ejemplo, linfocitos B), o linfocitos B), u otras células cualesquiera que expresan secuencias de la cadena pesada o ligera, de la región constante o variable o de la región marco o de la región determinante de la
20 complementariedad (CDR). Dichas células productoras de anticuerpos pueden ser células recombinantes o endógenas, y pueden ser también procariotas o eucariotas (por ejemplo, de mamífero, tales como, roedores, equino, ovinos, cabras, ovejas, primate, Véase, por ejemplo, Ausubel, anteriormente citado, et al., Immunology, anteriormente citado, Capítulo 2, incorporadas al presente
25 documento a modo de referencia en su totalidad.

Se pueden obtener también células productoras de anticuerpos a partir de la sangre periférica o, preferentemente el bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que se han inmunizado con el antígeno de interés. Cualquier otra célula hospedadora adecuada se puede
30 usar para expresar un ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento o variante especificada del mismo, de la presente invención, Se pueden aislar células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes utilizando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y clonarse mediante dilución limitante o clasificación
35 celular, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con

la especificidad deseada pueden seleccionarse mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)).

Se pueden usar otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero sin limitarse a, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc o similares, biblioteca de expresión; por ejemplo, disponible de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, Reino Unido; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Escocia, Reino Unido; Bioinvent, Lund, Suiza; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif.; Ixsys. Véanse, por ejemplo, los documentos PCT/GB91/01134, PCT/GB92/01755, PCT/GB92/002240, PCT/GB92/00883, PCT/GB93/00605, PCT/GB94/01422, PCT/GB94/02662, PCT/GB97/01835, WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, PCT/U594/1234, WO92/18619, WO96/07754, EP 614 989 ; WO95/16027 ; WO88/06630; WO90/3809 ; Patentes de los Estados Unidos N° 4.704.692 ; PCT/US91/02989 ; WO89/06283; los documentos EP 0 371 998 A2, los documentos EP 0 550 400 A2, los documentos EP 0 229 046; PCT/US91/07149 ; o los péptidos o proteínas generados estocásticamente Patentes de los estados Unidos N° 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5,976,862; documentos WO 86/05803, EP 0 590 689, incorporado cada uno completamente en el presente documento por referencia, o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997)). Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996)). Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998); incorporado cada uno completamente por referencia así como las patentes y solicitudes relacionadas) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, expresión de ribosomas (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (Mayo de 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Noviembre de 1998)); tecnologías de producción de anticuerpos monocelulares (Patente de los Estados Unidos, N° 5.627.052. Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); microgotícula de gel y citometría de flujo (Powell et al.,

Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, Mass.; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)). Selección de linfocitos B (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994). Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization
5 in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Países Bajos (1988)).

También pueden usarse métodos para diseñar mediante ingeniería genética o humanizar anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. En general, Un anticuerpo humanizado o diseñado
10 mediante ingeniería genética tiene uno o más restos de aminoácidos procedentes de una fuente que es no humana. Por ejemplo, pero sin limitarse a ratón; rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácidos humanos se denominan a menudo restos "importados", que se capturan normalmente de un dominio variable constante u otro dominio de
15 "importación" de una secuencia humana conocida. Se describen secuencias de Ig humanas conocidas, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento a modo de referencia.

Dichas secuencias importadas se pueden usar para reducir la
20 inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, avidez, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada como es conocido en la técnica. Generalmente se mantienen parte o todas las secuencias de las CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que parte o todas las secuencias no humanas de las regiones marco y/o constantes
25 se sustituyen con aminoácidos humanos u otros aminoácidos. Los anticuerpos pueden estar también opcionalmente humanizados con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables que utilizan modelos de inmunoglobulina tridimensionales que son conocidos por los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y
30 presentan estructuras tridimensionales conformacionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina
35 candidata para unirse con su antígeno. De esta forma, los restos (FR) pueden

seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importadas de tal modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los restos de la CDR están directa y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno. La humanización o diseño mediante ingeniería genética de anticuerpos de la presente invención puede llevarse a cabo utilizando cualquier método conocido, tales como pero sin limitarse a los descritos en, por ejemplo, Winter (Jones et al., Nature 321:5221986 Riechmann et al., Nature 332:3231988 Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988); Sims et al. J. Immunol. 151: 2296 (1993); (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), patentes de los Estados Unidos N° 5.723.323, 5,976.862, 5,824.514, 5,817.483, 5,814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567, incorporados cada uno al presente documento por referencia en su totalidad, incluidas las referencias citadas en los anteriores.

El anticuerpo anti-VISTA puede generarse también opcionalmente mediante la inmunización de un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, conejo, un hámster, primate no humano, y similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, Tal como se describe en el presente documento y/o se conoce en la técnica, Las células que producen un anticuerpo anti-VISTA humano se pueden aislar a partir de dichos animales e inmortalizarse usando los métodos adecuados, tales como los métodos descritos en el presente documento.

Los animales transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos que se unen a antígenos humanos pueden producirse mediante métodos conocidos (por ejemplo, pero sin limitarse a, patentes de los Estados Unidos N° 5.770.428, 5.569.825, 5.545.806, 5.625.126, 5.625.825, 5.633.425, 5.661.016 y 5.789.650 otorgados para Lonberg et al.; Jakobovits et al., documento WO 98/50433, Jakobovits et al., documento WO 98/24893, Lonberg et al., documento WO 98/24884, Lonberg et al., documento WO 97/13852, Lonberg et al., documento WO 94/25585, Kucherlapate et al. documento WO 96/34096, Kucherlapate et al. documento EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. documento EP 0710 719 A1, Surani et al. patentes de los Estados Unidos N° 5.545.807. Bruggemann et al. documento WO 90/04036,

Bruggemann et al. documento EP 0438 474 B1, Lonberg et al., documento EP 0814 259 A2, Lonberg et al., GB 2 272 440 A, Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4):579-591 (1994). Green et al, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997),
5 Taylor et al., Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Tuaillon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) y Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996), incorporado cada uno al presente documento por referencia en su totalidad). En general, estos ratones comprenden al menos un transgén que
10 comprende ADN de al menos un locus de inmunoglobulina humana que está funcionalmente reorganizado o que puede experimentar una reorganización funcional. Los locus de inmunoglobulina endógena en dichos ratones pueden alterarse o eliminarse para suprimir la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

15 La exploración de anticuerpos para la unión específica a proteínas o fragmentos similares puede conseguirse convenientemente utilizando bibliotecas de expresión de péptidos. Este método implica la exploración de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tienen la función o estructura deseadas. La exploración de anticuerpos de bibliotecas de
20 expresión de fagos se conoce bien en la técnica. Las secuencias peptídicas expresadas pueden ser de 3 a 5000 o más aminoácidos de longitud, frecuentemente de 5 a 100 aminoácidos de longitud, y a menudo de aproximadamente 8 a 25 aminoácidos de longitud. Se han descrito, además, de los métodos sintéticos químicos directos para generar bibliotecas de péptidos,

25 Algunos métodos de ADN recombinantes. Un tipo implica la expresión de una secuencia peptídica sobre la superficie de un bacteriófago o de células. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica concreta presentada. Dichos métodos se describen en las Publicaciones de Patente PCT N° 91/17271, 91/18980, 91/19818, y 93/08278.

30 Otros sistemas para generar bibliotecas de péptidos tienen aspectos de síntesis química in vitro y métodos recombinantes. Véanse las Publicaciones de Patente PCT N° WO 92/05258 92/14843, y 96/19256. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos N° 5.658.754, y 5.643.768. Hay bibliotecas de expresión de péptidos, vectores, y kits exploración comercialmente disponibles
35 de suministradores tales como Invitrogen (Carlsbad, Calif.), y Cambridge

antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido). Véanse, por ejemplo las patentes de los Estados Unidos N° 4.704.692, 4.939.666, 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030, 5.518.889, 5.534.621, 5.656.730, 5.763.733, 5.767.260, 5.856.456; 5.223.409, 5.403.484, 5.571.698, 5.837.500, asignada a Dyax,
5 5.427.908, 5.580.717; 5.885.793, asignada a Cambridge antibody Technologies; 5.750.373, asignada a Genentech, 5.618.920, 5.595.898, 5.576.195, 5.698.435, 5.693.493, y 5.698.417.

Se pueden preparar también anticuerpos de la presente invención utilizando al menos un anticuerpo anti-VISTA que codifica el ácido nucleico
10 para proporcionar animales transgénicos, tales como cabras, vacas, ovejas, y similares, que producen dichos anticuerpos en su leche. Se pueden proporcionar dichos animales utilizando métodos conocidos. Véanse, por ejemplo, pero sin limitarse a, las patentes de los Estados Unidos N° 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; 5.304.489, y similares,
15 cada una de las cuales se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

Los anticuerpos anti-VISTA de la presente invención se puede producir también utilizando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-
20 108 (Octubre, 1999), Cramer et al., *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240:95-118 (1999) y las referencias citadas en los anteriores; Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans* 22:940-944 (1994); y las referencias citadas en los anteriores. Cada una de las anteriores referencias se incorpora en este
25 documento por referencia en su totalidad.

Los anticuerpos de la invención pueden unir VISTA humano con un amplio intervalo de afinidades (K_D). En una realización preferida, al menos un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención puede unirse opcionalmente a VISTA humano con una afinidad elevada. Por ejemplo, un
30 anticuerpo monoclonal humano puede unirse a VISTA humano con una K_D igual a o menor de aproximadamente 10^{-7} M, tal como, pero sin limitarse a, 0,1-9,9 (o cualquier intervalo o valor del anterior) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o cualquier intervalo o valor de los anteriores. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a VISTA humano con una afinidad
35 de al menos 1×10^{-7} litros/mol, por ejemplo, al menos 1×10^{-8} litros/mol, por

ejemplo, al menos 1×10^{-9} litros/mol.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente utilizando cualquier método adecuado; (Véase, por ejemplo, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company, Nueva York, N.Y. (1992); y los procedimientos descritos en los anteriores) La afinidad de una interacción particular anticuerpo-antígeno medida puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal, pH). De esta manera, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (por ejemplo, K_D , K_a , K_d) se realizan preferentemente con soluciones normalizadas de un anticuerpo y un antígeno, y un tampón normalizado.

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO

Utilizando la información proporcionada en el presente documento, tal como las secuencias de nucleótidos que codifican al menos un 70-100 % de los aminoácidos contiguos de al menos uno de los fragmentos especificados, sus variantes o secuencias consenso, o un vector depositado que comprende al menos una de estas secuencias, se puede obtener una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica al menos un anticuerpo anti-VISTA que comprende todas las regiones CDR variables de la cadena pesada de las SEC ID N° 1 2 y 3 y/o todas las regiones CDR de la cadena ligera de las SEC ID N°:4 5 y 6 utilizando los métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden utilizar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNhn, ARNt o cualquier otra forma, o en la forma de ADN, incluyendo, pero sin limitarse a, ADNc o ADN genómico obtenidos mediante clonación o producidos sintéticamente, o cualquier combinación de las mismas. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier porción de al menos una hebra de ADN o ARN puede ser la hebra de codificación, conocida también como la hebra de sentido directo, o puede ser la hebra no codificante, denominada también como la hebra antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF), por ejemplo, pero sin limitarse a, al menos una porción

especificada de al menos una CDR, tal como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada o una cadena ligera; las moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de codificación de un anticuerpo anti-VISTA o fragmento, por ejemplo, un fragmento que comprende una región variable; y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, siguen codificando al menos un anticuerpo anti-VISTA tal como se describe en el presente documento y/o como se conoce en la técnica. Sería rutinario para un experto en la materia generar dichas variantes de ácido nucleico degeneradas que codifican anticuerpos anti-VISTA específicos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, et al., anteriormente citado, y se incluyen dichas variantes de ácidos nucleicos en la presente invención.

Como se indica en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-VISTA pueden incluir, pero no se limitan a: las que codifican la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo; la secuencia de codificación del anticuerpo completo o de una porción del mismo; las secuencias adicionales, tales como la secuencia de codificación de un líder de señalización o un péptido de fusión, con o sin las secuencias de codificación adicionales anteriormente mencionadas, tal como al menos un intrón, junto con secuencias no codificantes, adicionales, incluyendo pero sin limitarse a, secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias no traducidas transcritas, que juegan un papel en la transcripción, procesamiento del ARNm, que incluye señales de corte y empalme y de poliadenilación (por ejemplo-- unión a ribosoma y estabilidad del ARNm); una secuencia de codificación adicional que codifica aminoácidos adicionales, tal como aquellos que proporcionan funcionalidades adicionales. De esta manera, la secuencia que codifica un anticuerpo se puede fusionar a un marcador de secuencias, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende un fragmento o porción de anticuerpo.

Pueden derivarse genes humanos que codifican las regiones constantes (C) de los fragmentos de anticuerpos y regiones de la presente invención de una biblioteca derivada de hígado de feto humano, mediante métodos

conocidos. Se pueden derivar los genes de las regiones C humanas de cualquier célula humana que incluye las que expresan y producen inmunoglobulinas humanas. La región C_H humana se puede derivar de cualquiera de las clases o isotipos conocidos de las cadenas H humanas, incluyendo γ , μ , α , δ o ε y subtipos de las mismas, tales como G1, G2, G3 y G4. Debido a que el isotipo de la cadena H es responsable de las diversas funciones efectoras de un anticuerpo, la elección de la región C_H estará dirigida por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento, o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

10 COMPOSICIONES

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se preparan de acuerdo con procedimientos convencionales y se administran a dosificaciones que se seleccionan para tratar, por ejemplo, reducir, prevenir, o eliminar, o para retrasar o detener la progresión de, la dolencia que se está tratando (Véase, *por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. y Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y., cuya memoria descriptiva se ha incorporado por referencia en el presente documento. para una descripción general de los métodos para administrar diversos agentes para el tratamiento humano). Las composiciones que comprenden los anticuerpos y agentes descritos se pueden administrar usando sistemas de administración de liberación sostenida (*por ejemplo*, cápsulas, matrices biodegradables). Los ejemplos de sistemas de administración de liberación retardada para la administración de fármacos que serían adecuados para la administración de las composiciones de los compuestos descritos se describen en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N° 5.990.092, 5.039.660; 4.452.775; y 3.854.480 cuyo contenido completo se ha incorporado por referencia en el presente documento.

Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los anticuerpos anti-VISTA y/o los fragmentos de la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser tanto sólidos como líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de polvo para reconstitución en el momento de la administración. Un portador sólido puede

ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes suspensores, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes para comprimidos, o un material encapsulante. En polvos, el portador es un sólido finamente dividido que está
5 en una mezcla con el componente activo finamente dividido.

Los polvos y comprimidos contienen preferentemente entre aproximadamente uno a aproximadamente setenta por ciento del componente activo. Dichos portadores son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina almidón, gelatina, tragacanto,
10 metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión; manteca de cacao, y similares. Pueden usarse comprimidos, polvos, sellos, pastillas, tiras de fundido rápido, cápsulas y píldoras como formas farmacéuticas sólidas que contienen el componente activo adecuado para la administración oral.

15 Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, enemas para retenciones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Para inyección parenteral, se pueden formular preparaciones líquidas en disolución en una disolución acuosa de polietilenglicol.

20 La composición farmacéutica puede estar en volumen o en una forma farmacéutica unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, el envase contiene cantidades discretas de dosis unitarias, se puede variar las
25 dosificaciones dependiendo de las necesidades del paciente, la gravedad de la dolencia que está siendo tratada, el compuesto y la ruta de administración que se emplea. La determinación de la dosificación adecuada para una situación concreta está comprendida en los conocimientos del experto en la materia.

Asimismo, la composición farmacéutica puede contener, si se desea,
30 otros agentes compatibles, por ejemplo, agentes farmacéuticos, agentes terapéuticos o profilácticos. Los agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a: péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas, y moléculas orgánicas. Los
35 ejemplos de las clases de dichos agentes (por ejemplo, agentes

anticancerosos) incluyen, pero no se limitan a, citotoxinas, inhibidores de la angiogénesis, agentes inmunomoduladores, agentes inmunooncológicos, y agentes utilizados para proporcionar el alivio del dolor o para compensar los efectos perjudiciales de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, uso del

5 bifosfonato para reducir los efectos hipercalcémicos de los glucocorticoides).

Los inhibidores de la angiogénesis, agentes y tratamientos que son adecuados para el uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III: angiozima. Los bifosfonatos

10 incluyen, pero no se limitan a, alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato; pamidronato, risedronato, tiludronato, y zoledronato.

Los agentes y tratamientos inmunomoduladores que son adecuados para el uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos receptores antilinfocitos

15 T tales como anticuerpos dirigidos contra CD3 (por ejemplo, Nuvion (Protein Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o anticuerpos Rituxan dirigidos contra CD20 (IDEC)), anticuerpos dirigidos contra CD52 (por ejemplo CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos dirigidos contra CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)); anticuerpos contra citocinas o contra receptores de

20 citocinas y antagonistas tales como anticuerpos receptores contra IL-2 (Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos receptores contra IL-6 (por ejemplo MRA (Chugai)), y anticuerpos contra IL-12 (CNTO1275(Janssen)), y anticuerpos dirigidos contra TNFalfa (Remicade(Janssen)) o antagonistas del receptor de TNF (Enbrel (Immunex)), anticuerpos dirigidos contra IL-6 (BE8

25 (Diacione) y siltuximab (CNTO32 (Centocor)), y anticuerpos que se unen inmuno específicamente a antígenos asociados a tumores (por ejemplo, trastuzimab (Genentech)).

Los agentes inmunooncológicos que son adecuados para su uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen,

30 pero no se limitan a, ipilimumab (anti-CTLA-4), nivolumab (anti-PD-1), pembrolizumab (anti-PD-1), anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-LAG-3.

La composición se realiza preferentemente en forma de una dosificación unitaria que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento. Los ejemplos de las unidades de dosificación son comprimidos y

35 cápsulas. Para fines terapéuticos, los comprimidos y cápsulas pueden

contener, además del principio activo, portadores convencionales tales como aglutinantes, por ejemplo, goma arábiga, gelatina, polivinilpirrolidona, sorbitol, o tragacanto, cargas, por ejemplo, fosfato de calcio, glicina, lactosa, almidón de maíz, sorbitol, o sacarosa, lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, 5 polietilenglicol, sílice, o talco; disgregantes, por ejemplo almidón de patata, agentes aromatizantes o colorantes y agentes humectantes aceptables. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden estar en forma de soluciones acuosas u oleosas, las suspensiones, emulsiones, jarabes o elixires pueden contener aditivos adicionales tales como agentes suspensores, 10 agentes emulsionantes, agentes no acuosos, conservantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes. Los ejemplos de aditivos para preparaciones líquidas incluyen goma arábiga, aceite de almendra, alcohol etílico, aceite de coco fraccionado, gelatina, jarabe de glucosa, glicerina, grasas comestibles hidrogenadas, lecitina, metilcelulosa, para-hidroxibenzoato de metilo o propilo, 15 propilenglicol, sorbitol, o ácido sórbico.

Se conocen en la técnica otros detalles generales con respecto a los métodos de preparación y uso de los compuestos y composiciones descritas en el presente documento. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 7.820.169, cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad.

20 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Una persona experta en la materia, por ejemplo, un especialista clínico puede determinar la dosificación y ruta de administración adecuadas de un anticuerpo, fragmento o composición concretos para la administración a un individuo, considerando los agentes seleccionados, la formulación farmacéutica 25 y la ruta de administración, los diversos factores del paciente y otras consideraciones. Preferentemente, la dosificación no produce o produce efectos secundarios mínimos o adversos. En regímenes multidosisificación normalizados, se puede administrar un agente farmacológico o un calendario de dosificación que se diseña para mantener una concentración plasmática predeterminada u óptima en el sujeto que experimenta tratamiento. Los anticuerpos, fragmentos y composiciones que se pueden añadir en cualquier intervalo de dosificación adecuado o una cantidad terapéuticamente eficaz, por 30 ejemplo, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg, 10,0 35 mg/kg.

mg/kg, 11,0 mg/kg, 12,0 mg/kg, 13,0 mg/kg, 14,0 mg/kg, 15,0 mg/kg, 16,0 mg/kg, 17,0 mg/kg, 18,0 mg/kg, 19,0 mg/kg, 20,0 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg 60 mg/kg 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg y 100 mg/kg. En una realización, la dosificación de la composición, anticuerpo o fragmento administrados es de 1-15 mg/kg por administración.

El anticuerpo o fragmento se puede administrar una vez, al menos una vez, dos veces, al menos dos veces, tres veces, o al menos tres veces por día. El anticuerpo o fragmento se puede administrar una vez, al menos una vez, dos veces, al menos dos veces, tres veces, al menos tres veces, cuatro veces, al menos cuatro veces, cinco veces, al menos cinco veces, seis veces por semana, o al menos seis veces por semana. El anticuerpo o fragmento se puede administrar una vez al mes, al menos una vez al mes, dos veces al mes, al menos dos veces al mes, tres veces al mes o al menos tres veces al mes. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede administrar una vez al año, al menos una vez al año, dos veces al año, al menos dos veces al año, tres veces al año, al menos tres veces al año, cuatro veces al año, al menos cuatro veces al año, cinco veces al año, al menos veces al año, seis veces al año o al menos seis veces al año.

Los anticuerpos anti-VISTA, fragmentos o composiciones pueden, por ejemplo, administrarse por medios parenterales o no parenterales, incluyendo, pero limitación, por vía intravenosa, subcutánea, por vía oral, rectal, intramuscular, intraperitoneal, transmucosal, transdérmica, por vía intratecal, nasal, o por vía tópica. Una persona normalmente experta en la técnica reconocerá que las siguientes formas farmacéuticas pueden comprender como principio activo tanto los compuestos como una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente a un compuesto de la presente invención En algunas realizaciones, las formas farmacéuticas pueden comprender como principio activo, tanto un compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente de un compuesto.

Los anticuerpos anti-VISTA de la invención se pueden administrar como parte de un tratamiento combinado (*por ejemplo*, entre sí, o con uno o más de diferentes agentes terapéuticos). Los compuestos de la invención se pueden administrar antes, después o de forma simultánea con uno o más agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, se puede administrar simultáneamente un compuesto de la invención y un segundo agente terapéutico mediante el

mismo (*por ejemplo*, de forma concurrente) tanto en formulaciones separadas como en una única formulación. Como alternativa, Los agentes se pueden administrar secuencialmente, como composiciones separadas, en un marco de tiempo adecuado, tal como determine el especialista clínico experto (*por*
5 *ejemplo*, un tiempo suficiente para permitir un solapamiento de los efectos farmacéuticos de los tratamientos). Un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos diferentes se pueden administrar en una única dosis o en dosis múltiples, en un orden y con una pauta adecuada para conseguir un efecto terapéutico deseado.

10 La presente invención proporciona también un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente. En algunas realizaciones, los compuestos y composiciones de la presente invención se usan para tratar o prevenir el cáncer. El cáncer puede incluir cualquier tumor maligno o benigno de cualquier órgano o sistema
15 corporal. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: cánceres de mama, de sistema digestivo/gastrointestinal, endocrino, neuroendocrino, de ojo, genitourinario, de células germinales, ginecológico, de cabeza y cuello, hematológico/de la sangre, musculoesquelético, neurológico, respiratorio/torácico, de vejiga, de colon, rectal, de pulmón, endometrial, de
20 riñón, de páncreas, de hígado, de estómago, de testículo, esofágico, de próstata, de cerebro, de cuello de útero, de ovario y de útero. Otros cánceres pueden incluir leucemias, melanomas, y linfomas, y cualquier cáncer descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el tumor sólido está infiltrado con células mieloides y/o linfocitos T. En algunas realizaciones, el
25 cáncer es una leucemia, un linfoma, un síndrome mielodisplásico y/o un mieloma. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser cualquier clase o tipo de leucemia, incluyendo una leucemia linfocítica o una leucemia mielógena, tales como, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (mielógena) (AML), leucemia
30 mielógena crónica (CML), leucemia de células pilosas, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular extendida, o leucemia de linfocitos T adultos. En algunas realizaciones, el linfoma es un linfoma histocítico, linfoma folicular o linfoma de Hodgkin, y en algunas realizaciones, el cáncer es un mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido, por
35 ejemplo, un melanoma, o un cáncer de vejiga. En una realización particular, el

cáncer es un cáncer de pulmón, tal como un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

La presente invención también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos uno de leucemia, leucemia
5 aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), de linfocitos B, de linfocitos T o FAB ALL, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, un
10 linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor de
15 huesos relacionado con el cáncer, y similares. En algunas realizaciones, el tumor sólido está infiltrado con células mieloides y/o linfocitos T. En una realización particular, el tumor sólido es un cáncer de pulmón, tal como un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

En algunas realizaciones, los compuestos y tratamientos descritos en el
20 presente documento se administran simultáneamente con una vacuna (tal como una vacuna de vectores víricos, vacuna bacteriana, vacuna basada en células, vacuna de ADN, vacuna de ARN, vacuna peptídica, o vacuna de proteínas). Dichas vacunas son bien conocidas en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Jeffrey Schlom, "Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and
25 Moving Forward," *J Natl Cancer Inst*; 104:599-613 (2012); los contenidos de los cuales se incorporan en el presente documento en su totalidad.

En algunas realizaciones, los compuestos y tratamientos descritos en el presente documento se administran simultáneamente con agentes de quimioterapia, tratamientos de hormonas y tratamientos biológicos, y/o
30 bisfosfonatos. En algunas realizaciones, el(los) agente(s) de quimioterapia incluyen uno o más de los siguientes: carboplatino (paraplatino), cisplatino (Platinol, Platinol-AQ), ciclofosfamida (Citoxan; Neosar); doxorubicina (Adriamicina), etopósido (VePesid), fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar); irinotecán (Camptosar), paclitaxel (Taxol); topotecán (Hicamtin); vincristina
35 (Oncovin, Vincasar PFS), vinblastina (Velban).

En otras realizaciones, los compuestos y tratamientos anti-VISTA descritos en el presente documento se administran simultáneamente con uno o más anticuerpos del punto de control inmunes, tales como, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab, tremelimumab, ipilimumab, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-L2, anticuerpos anti-TIM-3 anti-LAG-3v, anticuerpos anti-OX40 y anticuerpos anti-GITR.

En otra realización, los compuestos y tratamientos anti-VISTA descritos en el presente documento se administran simultáneamente con uno o más inhibidores de moléculas pequeñas de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO).

Los compuestos y composiciones anti-VISTA de la invención pueden administrarse a un sujeto que lo necesita para prevenir (incluyendo prevenir la recurrencia del cáncer) o tratar un cáncer (por ejemplo, gestionar o mejorar un cáncer o uno o más de sus síntomas) cualquier agente o tratamiento (por ejemplo, quimioterapias, radioterapia, tratamientos dirigidos, tales como imatinib, sorafenib y vemurafenib, tratamientos hormonales, y/o tratamientos biológicos o inmunoterapias), que se sabe que son útiles, o que se han usado o se están usando actualmente para la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora del cáncer o uno o más de sus síntomas que se pueden usar en combinación con un compuesto o composición de la invención descrito en el presente documento. los agentes anticancerosos incluyen, pero no se limitan a: 5-fluorouracilo; acivicina; aldesleucina; altretamina; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; bicalutamida; sulfato de bleomicina; sodio brequinar; bropirimina; busulfán; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribine; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; estramustina fosfato de sodio; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina de sodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina;

interleucina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2) , interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-m; interferón alfa-n3; interferon beta-I a; interferon gamma-I b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreótido; letrozol; acetato de leuprólido; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedapa; mitomicina; mitosper; mitotano; Clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; ormaplatino; paclitaxel, pegaspargasa; porfromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; rogletimida; Clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparsomicina; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporquina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; topotecan; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporquina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina, Los tratamientos dirigidos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib, sorafenib, y vemurafenib). La invención abarca también la administración de un compuesto anti-VISTA de la invención combinado con una radioterapia que comprende el uso de rayos x, rayos gamma y otras fuentes de radiación que destruyen las células cancerosas. Se conocen en la técnica tratamientos contra el cáncer y se han descrito en dicha bibliografía como Physician's Desk Reference (57^a ed., 2003).

Son también útiles los anticuerpos anti-VISTA descritos en el presente documento, por ejemplo, En el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas, tales como VIH, VHB, VHC, y VHS, entre otros.

Se proporcionan diversas propiedades e información de las secuencias para seleccionar los anticuerpos anti-VISTA de la invención en las Tablas 1A, 1B y 2 en el presente documento.

Tabla 1A: Secuencias CDR de anticuerpos seleccionados completamente humanos o de anticuerpos VISTA humanizados dirigidos contra IgG humana

mAb ID	Familia VH	Cadena pesada cdr1 (Imgt)	Cadena pesada cdr2 (Imgt)	Cadena pesada cdr3 (Imgt)	Cadena ligera cdr1 (Imgt)	Cadena ligera cdr2 (Imgt)	Cadena ligera cdr3 (Imgt)
VSTB50	B	GYFTNYG (SEC ID N°:1)	INPYTGEP (SEC ID N°:2)	AREGYGNYIFPY (SEC ID N°:3)	ESVDTYANSL (SEC ID N°:4)	RAS (SEC ID N°:5)	QQTNEDPRT (SEC ID N°:6)
VSTB53		GYFTTHYT (SEC ID N°:7)	IIPSSGYS (SEC ID N°:8)	ARGAYDDYDYAMDY (SEC ID N°:9)	QTIVHSNGNTY (SEC ID N°:10)	KVS (SEC ID N°:11)	FQASHVPWT (SEC ID N°:12)
VSTB60	B	GYFTNYG (SEC ID N°:13)	INTYTGES (SEC ID N°:14)	ARDYGYIYVSAY (SEC ID N°:15)	ESVDNYANSF (SEC ID N°:16)	RAS (SEC ID N°:17)	QQSHEDPYT (SEC ID N°:18)
VSTB95		GFTFRNYG (SEC ID N°:19)	IISGGSYT (SEC ID N°:20)	ARIYDHDGDYAMDY (SEC ID N°:21)	QSIIVHSNGNTY (SEC ID N°:22)	KVS (SEC ID N°:23)	FQGSHPVWT (SEC ID N°:24)
VSTB112	D	GGTFSSYA (SEC ID N°:25)	IPIFGTA (SEC ID N°:26)	ARSSYGWSYEFDY (SEC ID N°:27)	QSIDTR (SEC ID N°:28)	SAS (SEC ID N°:29)	QQSAYNPIT (SEC ID N°:30)
VSTB116	D	GGTFSSYA (SEC ID N°:31)	IPIFGTA (SEC ID N°:32)	ARSSYGWSYEFDY (SEC ID N°:33)	QSINTN (SEC ID N°:34)	AAS (SEC ID N°:35)	QQARDTPIT (SEC ID N°:36)

5 Tabla 1B: Secuencias de la cadena pesada y ligera de anticuerpos VISTA seleccionados completamente humanos o humanizados dirigidos contra IgG humana

Proteína ID	AA CDS de la cadena pesada	AA CDS de la cadena ligera
VSTB50	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKA SGYTFTNYGLNWVRQAPGQGLEW MGWINPYTGEPTYADDFKGRFVFS LDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCA REGYGNIFPYWGQGTLLTVVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEC ID N°:47)	DIVMTQTPLSLSVTPG QPASISCRASESVDY ANSLMHWYLQKPGQP PQLLIYRASNLSESGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCQQ TNEDPRTFGGQTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:48)

Proteína ID	AA CDS de la cadena pesada	AA CDS de la cadena ligera
VSTB53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTHYTIHWVRQAPGQGLEWM GYIIPSSGYSEYNQKFDRVTMTRD TSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR GAYDDYYDYAMDYWGQGT LVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV P SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°:49)	DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSQTIVHS NGNTYLEWYLQKPGQ SPQLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCF QASHVPWTFGQG TKL EIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGE C (SEC ID N°:50)
VSTB60	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKA SGYTFTNYGMTWVRQAPGQGLEW MGWINTYTGESTYADDFKGRFVFS LDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCA RDYYGIYVSAYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLG GP SVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEC ID N°:51)	DIVMTQTPLSLSVTPG QPASISCRASESDNY ANSFMHWYLQKPGQS PQLLIYRASNLESGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCQQ SHEDPYTFGQG TKLEI KRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:52)

Proteína ID	AA CDS de la cadena pesada	AA CDS de la cadena ligera
VSTB95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFRNYGMSWVRQAPGKGLEW VASIISGGSYTYYPDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RIYDHDGDYYAMDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°:53)	DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSQSIVHS NGNTYLEWYLQKPGQ SPQLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCF QGSHVPWTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGE C (SEC ID N°:54)
VSTB112	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVTVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEC ID N°:55)	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCRASQSIDTRL NWYQQKPGKAPKLLIY SASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQSAYNPI TFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEC ID N°:56)

Proteína ID	AA CDS de la cadena pesada	AA CDS de la cadena ligera
VSTB116	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEC ID N°:57)	DIQMTQSPSSLSASVG DRV TITCRASQSINTNL NWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQARDTPI TFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSG TASV VCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEC ID N°:58)
VSTB140*	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSNF GTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRV VSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEC ID N°:59)	DIQMTQSPSSLSASVG DRV TITCRASQSIDTRL NWYQQKPGKAPKLLIY SASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSAYNPI TFGQGTKVEIKRTVAA <u>PSVFIFPPSDEQLKSG</u> <u>TASV VCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNS</u> <u>QESVTEQDSKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSKADYEKHKV</u> <u>YACEVTHQGLSSPVTK</u> <u>SFNRGEC</u> (SEC ID N°:56)

Proteína ID	AA CDS de la cadena pesada	AA CDS de la cadena ligera
VSTB149* ^Δ	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSED ^Δ TAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGT ^Δ LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAP PVAGPDV FLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSN AALPAPIAKT ISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEC ID N°:60)	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCRASQSIDTRL NWYQQKPGKAPKLLIY SASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFLT ^Δ ISSLQP EDFATYYCQQSAYNPI TFGQGTKVEIKRTVAA <u>PSVFIFPPSDEQLKSG</u> <u>TASVVCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNS</u> <u>QESVTEQDSKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSKADYEKHKV</u> <u>YACEVTHQGLSSPVTK</u> <u>SFNRGEC</u> (SEC ID N°:56)
VSTB174*	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSED ^Δ TAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGT ^Δ LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEC ID N°:61)	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCRASQSIDTRL NWYQQKPGKAPKLLIY SASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFLT ^Δ ISSLQP EDFATYYCQQSAYNPI TFGQGTKVEIKRTVAA <u>PSVFIFPPSDEQLKSG</u> <u>TASVVCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNS</u> <u>QESVTEQDSKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSKADYEKHKV</u> <u>YACEVTHQGLSSPVTK</u> <u>SFNRGEC</u> (SEC ID N°:56)

*Secuencias de la región constante en VSTB140, VSTB149 y VSTB174 están subrayados. ^ΔRestos de aminoácidos que confieren resistencia a la proteasa en la cadena pesada de VSTB149 están indicados en negrita.

Tabla 2: Constante de disociación (K_D) para seleccionar anticuerpos anti-VISTA

Muestra	K_D (M)	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)			
S1	1,71E-10	1,69E+06	2,89E-04	1,09E-10	1,11E+06	1,21E-04
S40	5,07E-10	1,46E+05	7,40E-05	6,96E-10	1,39E+05	9,69E-05
S41	6,32E-10	4,82E+05	3,05E-04	3,10E-10	7,08E+05	2,19E-04
S42	1,04E-10	1,05E+06	1,09E-04	2,65E-10	5,13E+05	1,36E-04
S43	2,64E-11	1,25E+06	3,30E-05	5,28E-11	1,18E+06	6,22E-05
S44	2,53E-11	1,23E+06	3,12E-05	6,40E-11	9,93E+05	6,36E-05
S45	2,35E-11	1,58E+06	3,72E-05	2,58E-11	1,46E+06	3,77E-05
S46	1,06E-10	1,56E+06	1,66E-04	2,96E-10	1,50E+06	4,44E-04
S47	3,56E-10	5,14E+05	1,83E-04	2,52E-10	5,69E+05	1,43E-04
S33	8,30E-10	1,23E+06	1,02E-03	1,22E-09	8,96E+05	1,10E-03
S34	1,08E-09	5,95E+05	6,43E-04	2,80E-09	5,20E+05	1,46E-03
S35	8,06E-11	2,08E+06	1,68E-04	1,35E-10	1,78E+06	2,41E-04
S36	6,29E-11	1,77E+06	1,12E-04	2,90E-11	1,58E+06	4,58E-05
S37	2,23E-09	5,10E+05	1,14E-03	4,43E-09	3,94E+05	1,75E-03
S38	2,26E-09	5,18E+05	1,17E-03	2,03E-09	5,37E+05	1,09E-03
S39	5,62E-10	3,97E+05	2,23E-04	3,47E-10	4,15E+05	1,44E-04
S25	1,31E-09	6,21E+05	8,12E-04	1,10E-09	5,65E+05	6,24E-04
S26	Sin unión			3,53E-09	2,38E+05	8,41E-04
S27	1,13E-09	8,86E+05	9,97E-04	1,61E-09	7,12E+05	1,15E-03
S48	3,12E-10	1,24E+06	3,87E-04	1,21E-09	8,78E+05	1,06E-03
S28	2,03E-09	1,08E+06	2,19E-03	2,03E-09	9,30E+05	1,88E-03
S29	3,78E-11	1,42E+06	5,38E-05	8,90E-11	9,06E+05	8,06E-05
S30	Sin unión			Sin unión		
S31	Unión débil			Unión débil		
S32	Unión débil			Unión débil		
S15	9,34E-11	6,46E+05	6,04E-05	5,13E-10	3,50E+05	1,80E-04
S16	1,26E-10	5,54E+05	6,99E-05	1,92E-10	4,43E+05	8,53E-05
S17	7,68E-10	9,88E+05	7,59E-04	4,10E-10	7,09E+05	2,91E-04
S18	2,28E-09	4,90E+05	1,12E-03	1,05E-09	3,13E+05	3,29E-04
S19	1,54E-09	1,02E+06	1,58E-03	2,86E-10	7,03E+05	2,01E-04
S20	1,48E-09	6,67E+05	9,85E-04	4,57E-10	6,36E+05	2,91E-04
S21	3,18E-09	3,16E+05	1,00E-03	1,34E-09	2,70E+05	3,60E-04
S22	2,98E-09	1,09E+06	3,25E-03	1,27E-09	1,25E+06	1,59E-03
S6	6,36E-10	5,28E+05	3,36E-04	3,02E-10	5,98E+05	1,80E-04
S7	6,75E-10	1,31E+06	8,87E-04	3,27E-10	1,15E+06	3,75E-04
S8	1,15E-10	1,89E+06	2,18E-04	5,97E-11	1,25E+06	7,48E-05
S9	1,67E-10	1,87E+06	3,11E-04	9,31E-11	1,27E+06	1,18E-04
S10	8,90E-11	1,55E+06	1,38E-04	4,30E-11	1,22E+06	5,27E-05
S12	4,94E-10	1,57E+06	7,76E-04	2,39E-10	1,19E+06	2,86E-04

Muestra	KD (M)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)			
S13	1,02E-10	1,42E+06	1,44E-04	6,46E-11	9,55E+05	6,17E-05
S14	2,02E-10	1,26E+06	2,55E-04	7,55E-11	1,12E+06	8,43E-05
S1	2,06E-10	1,60E+06	3,29E-04	8,35E-11	1,21E+06	1,01E-04
S2	1,56E-10	9,74E+05	1,52E-04	8,66E-11	7,25E+05	6,28E-05
S3	4,33E-11	9,07E+05	3,93E-05	4,89E-11	7,41E+05	3,63E-05
S4	1,52E-10	8,98E+05	1,36E-04	7,54E-11	6,93E+05	5,23E-05
S49	1,45E-10	1,01E+06	1,46E-04	1,04E-10	7,28E+05	7,60E-05
S5	2,13E-10	1,25E+06	2,67E-04	1,37E-10	8,51E+05	1,17E-04

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VISTA EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS

5 Métodos:

Preparación y tinción de PBMC humano reciente para la expresión de VISTA.

Se ensayó la expresión de VISTA en PBMC humano aislado recientemente (células mononucleadas de sangre periférica) de varios donantes. Se usó VISTA-biotina dirigida contra VISTA humana (GA-1) para la tinción (5 µg/ml). IgG1 de ratón Se usó biotina K (Clon MOPC-21, a 5 µg/ml) como un control de isotipo.

Material donante.

Se obtuvieron muestras de sangre de Biological Specialty Corp. (Colmar, PA) y se recogieron y analizaron el mismo día. Se enviaron 10 ml de sangre completa que contenía sulfato de heparina para el análisis.

Preparación de la muestra

Se diluyó sangre 1:1 en PBS estéril. 22 ml de sangre de la médula se distribuyeron en capas en 20 ml de Ficoll-Hypaque estériles (GE Healthcare N° de cat 17-144003) en tubos cónicos de 50 ml. Se centrifugaron los tubos a 1800 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se cosecharon células mononucleares en la interfase tras la centrifugación utilizando un pipeteador de 1 ml y se combinaron en dos tubos cónicos de 50 ml. Se añadió PBS estéril a cada tubo para preparar el volumen hasta 50 ml y se centrifugaron las células a 300g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se volvieron a suspender las células en 50 ml de PBS estéril y se hicieron girar los tubos a 300g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se combinaron

las células y se volvieron a suspender en 50 ml de PBS estéril antes del recuento.

Protocolo de tinción: Se usó un vial congelado que contenía 5×10^7 PBMC para los controles de compensación y como un control para la tinción.

5 Se utilizaron los reactivos y/o consumibles siguientes:

Se usó tampón de tinción FACS (BSA) de BD Biosciences (Nº de cat 554657) suplementado con EDTA al 0,2 %; solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Nº de cat de Gibco 14190); placa de fondo redondeado de polipropileno de 96 pocillos (BD Nº 3077); tubos en clúster de 1,2 ml de polipropileno (Corning Nº 4451); clon GA-1 anti-VISTA biotinilado de ImmunoNext Lote Nº 080612B (utilizado a 5 µg/ml); mIgG1 biotinilado, isotipo K de control (Clon MOPC-21); Biolegend Nº de cat 400104, Nº de lote B116649 (utilizado a 5 µg/ml); anticuerpos dirigidos contra IgG humana (véase a continuación la tabla de tinciones); colorante de vida/muerte próximo al infrarrojo (Invitrogen, Nº de Cat. L10119); y reactivos de estreptavidina que incluyen STP-APC (BD Biosciences Nº de Cat. 554067, Lote Nº 04251) (utilizado a una dilución 1:200 en tampón FACS), STP-PE (Biolegend Nº de Cat. 405203, Lote Nº B139688) (utilizado a una dilución 1:200 en tampón FACS), STP-PE Cy7 (mostró una unión no específica en las muestras de control de isotipo), STP-Q605 (Invitrogen Nº de Cat. Q10101MP, Lote Nº 53449A) (utilizado a una dilución 1:200 en tampón FACS).

Protocolo de tinción superficial celular

25 Antes de la tinción Se transfirieron 1×10^6 células en placas de fondo redondeado de 96 pocillos y se lavaron con 150 µl de PBS. A continuación se centrifugaron las placas a 1300 rpm a 4 °C durante 3 minutos.

Posteriormente, se lavaron las células de nuevo en PBS y se centrifugaron tal como se ha descrito anteriormente.

30 A continuación se llevó a cabo la tinción de vida/muerte en 50 µl de PBS que contenía 0,25 µl de colorante de vida/muerte próximo al infrarrojo. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos con 150 µl de tampón de tinción de FACS y se centrifugó a 1300 rpm a 4 °C durante 3 minutos se descartó el sobrenadante.

35 Se bloquearon las células con suero humano a 1:100 en 50 µl de tampón de tinción FACS. Se incubaron las placas a 4 °C durante 15 minutos. A continuación se lavaron los pocillos con 150 µl de tampón de tinción FACS y se

centrifugaron a 1300 rpm a 4 °C durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante.

- 5 A continuación se añadió un cóctel que contenía los siguientes anticuerpos a cada pocillo para la tinción superficial: Se describen los cócteles en las Tablas 3-6 a continuación. Cada cóctel se utilizaría independientemente de los otros dependiendo de las poblaciones de interés.

Tabla 3: Tinción de linaje

Diana										
Flúor	Antígeno	Ratón	Rata	Humano	Isotipo	Clon	Suministrador	Nº de Cat.	Nº de lote	Título (µl/10 ⁶ células)
FITC/AF488	CD19			X	mlgG1	H1B19	Biolegend	302206	B123019	2
PE	CD11b			X	mlgG1, K	ICRF44	BD Bio.	555388	45134	2
PerCP-Cy5.5	HLA-DR			X	mlgG2a, K	G46-6	BD Bio.	560652	25161	0,5
PE Cy7	CD16			X	mlgG1, K	3G8	BD Bio.	557744	87825	0,2
APC Cy7	NIR vivo/muerto			X						
AF700	CD56			X	mlgG1, K	B159	BD Bio.	557919	19470	1
APC/AF647	VISTA-Bio			X						
PB/V450	CD3			X	mlgG1, K	UCHT1	BD Bio.	558117	90926	0,5
Q605	CD14			X	mlgG2a, K	TuK4	Invitrogen	Q10013	1049158	0,2

Tabla 4: Tinción de linfocitos T

Diana										
Flúor	Antígeno	Ratón	Rata	Humano	Isotipo	Clon	Suministrador	Nº de Cat.	Nº de lote	Título (µl/10 ⁶ células)
FITC/AF488	CD4			X	mlgG1, K	RPA-T4	BD Bio.	555346	38460	2
PE	VISTA-Bio			X						
PerCP-Cy5.5	CD8			X	mlgG1, K	RPA-T8	BD Bio.	560662	1037	0,5
PE Cy7	CD56			X	mlgG1, K	B159	BD Bio.	557747	47968	0,5
APC Cy7	NIR:			X						
AF700	CD45RO			X	mlgG2a, K	UCHL1	Biolegend	304218	B143062	1
APC/AF647	TCRgd			X	mlgG, K	B1	Biolegend	331212	B126473	2
PB/V450	CD45RA			X	mlgG2b, K	HI100	BD Bio.	560363	90928	0,5
Q655	CD3			X	mlgG2a	S4.1	Invitrogen	Q10012	982352	0,5

Tabla 5: Tinción DC

Diana										
Flúor,	Antígeno	Ratón,	Rata	Humano	Isotipo	Clon	Suministrador	Nº de Cat.	Nº de lote	Título (µl/10 ⁶ células)
FITC/AF488	Lin1			X	Mezcla	Mezcla	BD Bio.	340546	2152758	5
PE	CD11c			X	mlgG1, K		BD Bio.	555392	45123	2
PerCP-Cy5.5	HLA-DR			X	mlgG2a, K	G46-6	BD Bio.	560652	25161	0,5
APC Cy7	NIR:			X						
APC/AF647	CD83			X	mlgG1, K	HB15e	BD Bio.	551073	57688	2
BV421	CD123			X	mlgG1, K	6H6	Biolegend	306017	B148193	0,5
Q605	VISTA-Bio			X						

Tabla 6: Cepa mieloide

Diana										
Flúor	Antígeno	Ratón	Rata	Humano	Isotipo	Clon	Suministrador	Nº de cat	Nº de lote	Título (µl/10 ⁶ células)
FITC/AF488	CD33			X	mlgG1	HM3-4	Biolegend	303304	B100963	3
PE	CD11b			X	mlgG1, K	ICRF44	BD Bio.	555388	45134,	2
APC Cy7	NIR:			X						
APC/AF647	VISTA-Bio			X						
Q605	CD45			X	mlgG1, K	HI30	Invitrogen	Q10051	880470	1

Tras la tinción superficial, se lavaron las células dos veces tal como se ha descrito anteriormente con tampón de tinción FACS y se centrifugaron a 1300 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se volvieron a suspender las muestras en 50 µl de tampón de tinción FACS que contenía la estreptavidina marcada fluorescentemente adecuada. Se incubaron las muestras a 4 °C durante 30 minutos. Se lavaron las células con 150 µl de tampón de tinción FACS y se centrifugaron a 1300 rpm a 4°C durante 5 minutos. Esta etapa de lavado se repitió antes de que se volvieran a suspender las muestras en 250 µl de tampón de tinción FACS. Las muestras se analizaron en un analizador celular BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) el mismo día.

Análisis de los datos

Se volvieron a analizar los datos de citometría de flujo utilizando el software FlowJo Version 9 para clasificar poblaciones fenotípicas específicas. Se usó la enumeración de la media geométrica para comparar la expresión de VISTA en diferentes subconjuntos celulares. Se normalizó cada población para el fondo sustrayendo los calores control del isotipo de los valores medios de las muestras tratadas anti-VISTA. Se prepararon los gráficos en Prism y se

llevaron a cabo las estadísticas utilizando el test de la T de Student si solo se compararon dos muestras, o ANOVA monolateral con ensayos posteriores de Bonferroni.

Resultados:

5 Expresión de VISTA en subconjuntos mieloides y linfoides humanos:

Como se muestra en las Figuras 2A-2E, 3A-3G, 4, 5A-5B y 6A-6C, La expresión de VISTA en monocitos CD14⁺ fue significativamente diferente de las otras poblaciones ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre otras poblaciones. Los monocitos expresaron los niveles más elevados de VISTA en sangre periférica, teniendo el subconjunto CD14⁺CD16⁻ una expresión significativamente mayor que las células CD14^{lo}CD16⁺. Mientras que las APC mostraron una expresión moderada de VISTA, los subconjuntos linfoides mostraron niveles de expresión bajos.

Expresión de VISTA en subconjuntos T y NK humanos:

15 Como se muestra en las Figuras 7A-7E, 8A-8G y 9, con subconjuntos NK, células CD56^{lo} presentaron niveles de expresión de VISTA significativamente mayores que las células CD56^{Hi} NK. De los subconjuntos de linfocitos T las células CD8⁺ con memoria expresaron los niveles de expresión más elevados, aunque los linfocitos T CD8⁺ o los linfocitos T CD4⁺ no expuestos a tratamiento no fueron significativamente mayores.

Expresión de VISTA en subconjuntos de células dendríticas humanas

Como se muestra en las Figuras 10A-10D, 11A-11C and 12, no hubo diferencias significativas en la expresión de VISTA observada; Los DC y los basófilos presentaron una expresión baja de VISTA, siendo generalmente mayores las células dendríticas plasmacitoides (pDC) pero no en un grado significativo.

Conclusión: Estos resultados muestran la expresión de VISTA en varios subconjuntos de células inmunes, y que VISTA se expresa de forma más elevada en monocitos, con alguna expresión en diferentes subconjuntos de linfocitos T y células NK, y poca a ninguna expresión en linfocitos B.

EJEMPLO 2: EXPRESIÓN DE VISTA EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Métodos:

35 Tinción de sangre completa: Se tiñó sangre completa recién aislada (100 μ l) con cócteles de anticuerpos como se indica a continuación mediante

incubación durante 30 minutos a 4 °C. Se lisaron células rojas de la sangre (RBC) con tampón de lisis RBC y las células restantes se lavaron 1x con tampón de tinción. Las células se volvieron a suspender en 200 µl de tampón de tinción. Los datos se recogieron usando un citómetro de flujo MACSQuant y se analizaron usando el programa informático de análisis FlowJo.

Tinción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC): Ser aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre completa utilizando un gradiente de Ficoll. 1×10^6 aisladas recientemente se tiñeron con cócteles de anticuerpos en 100 µl de tampón de tinción. Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 4 °C, a continuación se lavaron una vez con tampón de tinción. Las células se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de tinción. Se recogieron los datos usando un citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi Biotec) y se analizaron utilizando el software de análisis FlowJo.

Los anticuerpos usados fueron los anticuerpos CD11b, CD33, CD177, CD16, CD15, CD14, CD20, HLADR, CD3, CD4, CD8, CD127, CD69 y FOXP3 (Biolegend, San Diego, CA). Se preparó VISTA de ratón conjugada con APC dirigida contra IgG humana (clon GG8) mediante ImmuNext (Lebanon, NH).

Conclusiones:

Expresión de VISTA en células de la sangre periférica humana sanas

Se analizaron células mononucleares de sangre completa y células mononucleares de sangre periférica para la expresión de VISTA utilizando citometría de flujo multicolor. Tal como se muestra en las Fig. 15A y 15B, el nivel más elevado de la expresión de VISTA se detectó en monocitos seguido por neutrófilos. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ expresaron un bajo nivel de VISTA como se muestra en la Figura 13C y 13D.

Expresión de VISTA en células de la sangre periférica humana de un paciente con cáncer.

Tal como se muestra en las Figuras 14A-C, se analizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer de pulmón. La Figura 14A es un diagrama de flujo representativo que muestra el análisis de monocitos CD14⁺ y células supresoras derivadas de mielóide CD15⁺ (MDSC). Los resultados sugieren que fenotípicamente, las células CD15⁺ son MDSC derivados de neutrófilos. Además, estas células están ausentes en muestras de sangre sanas. La Figura 14B es un histograma representativo de la expresión de VISTA en monocitos derivados de un paciente sano y con

cáncer lo que sugiere un nivel mayor de la expresión de VISTA en células de un paciente con cáncer en comparación con los controles sanos. De forma similar, se ha encontrado un mayor nivel de VISTA en MDSC en pacientes con cáncer, tal como se muestra en la Figura 14C.

5 La Figura 15A es un gráfico FACS representativo que muestra la presencia de neutrófilos derivados de MDSC en la sangre de pacientes con cáncer de colon. Las Figuras 15B y 15C son histogramas representativos que muestran un nivel mayor de expresión de VISTA en monocitos de pacientes con cáncer en comparación con muestras de sangre de donantes sanos.

10 Expresión de VISTA en células de la sangre periférica de macacos.

Tal como se muestra en la Figura 16A y 16B del análisis de citometría de flujo de sangre completa de mono reveló un patrón de expresión similar al de VISTA en células humanas. Los monocitos y neutrófilos expresaron el nivel más elevado de VISTA en comparación con linfocitos T CD4⁺ (Figura 16C) y CD8⁺ (Figura 16D).

EJEMPLO 3: EXPRESIÓN DE VISTA EN LÍNEAS DE CÉLULAS MALIGNAS AL NIVEL DEL ARN Y AL NIVEL DE LA PROTEÍNA

Debido a que VISTA se expresa en neoplasias malignas heme, un anticuerpo anti-VISTA podría dirigirse potencialmente a las células malignas para la destrucción, así como bloquear VISTA y promover las respuestas inmunes antitumorales.

Los datos incluyen el análisis de la secuencia de ARN de ~140 líneas de células malignas heme (se han repetido algunas líneas de células en el análisis). Los datos se muestran en la Figura 17.

25 Los valores de la sec. de ARN se relacionan como valores de FPKM (Fragmentos por kilobase de exones por millones de fragmentos cartografiados).

Esencialmente, esto significa que todas las lecturas que estaban comprendidas en las regiones exónicas de un gen se contaron y normalizaron por la longitud del gen y el número total de lecturas por muestra (para contar las diferencias intermuestra) El valor de corte es 1: por encima de 1 es positivo para la expresión de VISTA (al nivel del ARN), por debajo de 1 es negativo para la expresión de VISTA.

Los resultados indican que muchas líneas de células son positivas al nivel del ARN, principalmente las leucemias mieloides agudas y las leucemias

mielógenas crónicas. Esto se puede esperar debido a que VISTA se expresa mucho en células mieloides normales, y debido a que se cree que su función es la de disminuir las respuestas inmunes, incluyendo respuestas inmunes antitumorales.

5 EJEMPLO 4: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA VISTA

Desplazamiento de fagos

Se llevaron a cabo veinticuatro experimentos de desplazamiento de fagos para enriquecer fagos reactivos con VISTA-His de Cyno. Se usó la
10 proteína VISTA de macaco para estos experimentos, que mostraron una mejor conjugación de la biotina que la proteína VISTA humana. Para determinar el éxito de los experimentos de fagos, se añadieron combinados de fagos de los ciclos de desplazamientos individuales a las placas de neutravidina revestidas con VISTA-His de cyno biotinilada y se detectaron con un anticuerpo anti-M13
15 conjugado con HRP. Se repicaron colonias individuales de los ciclos de selección de fagos y se produjeron proteínas Fab en placas de 96 pocillos. Los sobrenadantes Fab expresados se evaluaron para la unión a VISTA-His de cyno biotinilado. Esto dio como resultado más de 200 hits.

Se amplificaron las regiones VH y VL de las placas Fab, se sometieron a
20 secuenciación del ADN y se exportaron como ficheros FASTA. Cuando se repicaron los clones que debían convertirse y ensayarse como MAB, se escogieron los clones basándose en la diversidad de secuencias así como teniendo riesgos de modificación posteriores a la traducción limitada y tan pocos restos hidrófobos como sea posible.

25 Los clones de fagos de VH y VL se subclonaron en vectores de expresión IgG1/kappa de mamíferos y se transfectaron en células HEK293. Los anticuerpos se purificaron en resina de afinidad de flujo rápido de proteína A sefarosa. Se determinó la concentración de los MAB de fago mediante ELISA cuantitativo utilizando medidas Nanodrop, El panel del anticuerpo se expresó a
30 niveles elevados. El análisis de SDS-PAGE demostró la integridad de cada variante de anticuerpo expresada.

Se llevó a cabo la maduración en línea de los anticuerpos contra fago amplificando los dominios VH de las mezclas de anticuerpos policlonales del último ciclo de desplazamiento para la clonación en vectores de fagos que
35 tienen diversidad en VL. Esto dio como resultado un combinado VH enriquecido

que se muestreó con una diversidad adicional en el VL. El fago se capturó a través de 1-2 ciclos de desplazamiento restrictivos con la esperanza de identificar aglutinantes de elevada afinidad con la proteína VISTA ECD His. Se llevó a cabo un ELISA de Fab monoclonal para determinar el éxito de la maduración. Los datos de ELISA y de la expresión se normalizaron para un clon de referencia configurado a 100 % a partir del experimento de desplazamiento de novo original y se identificaron los clones madurados por afinidad con una mayor señal de unión al antígeno de VISTA de cyno que el clon de referencia. Este proceso generó algunos clones que demostraron hasta un 200 % de unión cuando se cribaron a una baja concentración de antígenos (1 nM), los clones con afinidad más elevada se secuenciaron y produjeron como MAB.

Generación del hibridoma

Un grupo de ratones BALB/cAnNCrI recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de 50 µg de proteína recombinante Hu VISTA-Ig (Sino) emulsionada en adyuvante completo de Freund seguido dos semanas después por una inyección IP de 50 µg de proteína recombinante Hu VISTA-Ig emulsionada en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después, los ratones recibieron una inyección IP de 50 µg de proteína recombinante VISTA de cyno-Fc emulsionada en adyuvante incompleto de Freund. Todos los ratones recibieron una inyección final de 25 µg de VISTA de cyno humano y 25 µg de VISTA de cyno en la base de la cola en PBS, cinco días antes de la cosecha esplénica para la fusión.

Dos semanas después, los ratones recibieron una inyección IP de 50 µg de proteína recombinante VISTA de cyno-Fc emulsionada en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después, los ratones recibieron una inyección IP de 50 µg de proteína recombinante Hu VISTA-His emulsionada en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después, los ratones recibieron una inyección IP de 50 µg de proteína recombinante cyno Vista-His emulsionada en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después todos los ratones recibieron una inyección final de 25 µg de Cino VISTA-HIS en PBS, tres días antes de la cosecha esplénica para la fusión.

El día de la fusión, Los ratones se sometieron a eutanasia mediante asfixia con CO₂, los bazo se retiraron et alocaron en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato Se preparó una suspensión de células individuales de

esplenocitos mediante molienda de bazo a través de una criba de malla fina con una malla pequeña de mortero y se enjuagó con PBS a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez en PBS y se sometieron a lisis RBC. En resumen, Se volvieron a suspender las células en 3 ml de tampón de lisis RBC /Signa N°R7757) por cada bazo y se colocaron en hielo durante 5 minutos. Las células se lavaron de nuevo una vez en PBS a temperatura ambiente y se marcaron para la clasificación magnética. Como para las instrucciones del fabricante. Las células se marcaron con Thy1.2 dirigido contra IgG de murino, CD11b dirigido contra IgG de murino y perlas magnéticas de IgM dirigido contra murino (Miltenyi Biotec N° 130-049-101, 130-049-601 y 130-047-301 respectivamente) se clasificaron a continuación utilizando una columna MS con un Midi MACS. Las fracciones celulares negativas (se descartaron las fracciones celulares positivas) se fusionaron en células FO. Se llevó a cabo la fusión a una relación 1:1 de células de mieloma murino con células de bazo viables. En resumen, Las células de bazo y mieloma se mezclaron juntas, se aglomeraron y lavaron una vez en 50 ml de PBS, El aglomerado se volvió a suspender con una solución de 1 ml de polietilenglicol (PEG) (2 g de peso molecular de PEG 4000, 2 ml de DMEM, 0,4 ml de DMSO) por 10e8 de esplenocitos a 37°C durante 30 segundos. La mezcla de fusión celular se sumergió a continuación en un baño de agua a 37 °C durante aproximadamente 60 segundos con agitación suave. La reacción de fusión se detuvo añadiendo lentamente 37 °C de DMEM durante 1 minuto. Las células fusionadas se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. A continuación las células se volvieron a suspender en medio E-HAT (MedioE (StemCell Technologies N° de Cat. 03805) que contiene HAT (Sigma n2 de cat H0262) y se sembraron en placas de cultivo de tejido de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Corning # 3997).

Se usó EIA de captura para cribar los sobrenadantes del hibridoma para los anticuerpos específicos de VISTA de cyno. En resumen, las placas (Nunc-Maxisorp N° 446612) se revistieron durante al menos 60 minutos con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón (Fc) (Jackson N°115-006-071) en tampón de revestimiento (Thermo 28382). Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de 0,4 % (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 30 minutos a TA Se lavaron las placas una vez y se añadieron 50 µl/pocillo de

sobrenadante del hibridoma Se lavaron las placas una vez y se añadieron 50 μ l/pocillo de 0,1 μ g/ml de VISTA de cyno-hulg y se incubaron a TA durante 30 minutos. Se lavaron las placas una vez y 1:40.000 de Estreptavidina HRP (Jackson 016-030-084) en BSA/PBS al 0,4 % se añadió a las placas y se incubaron durante 30 minutos a TA. Se lavaron las placas 3x y se desarrollaron posteriormente utilizando 100 μ l/pocillo de sustrato TMB Turbo (Thermo Scientific 34022) incubando aproximadamente 10 minutos a TA. La reacción se detuvo utilizando 25 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 4N y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas automatizado. Se seleccionaron quince de los hitos principales para la subclonación limitando la dilución y se cribaron en el mismo formato de exploración principal.

Todas las líneas de células de hibridoma reactivas a VISTA de cyno se sometieron a exploración cruzado utilizando IG de VISTA humano para evaluar la reactividad cruzada. En resumen, las placas (Nunc-Maxisorp N° 446612) se revistieron a 4 μ g/ml con anticuerpo de cabra dirigido contra ms Fc (Jackson N°115-006-071) en tampón de carbonato-bicarbonato de sodio, pH 9,4 (Pierce 28382 BupH™) O/N a 4 °C. Sin lavar, los pocillos se bloquearon con 200 μ l de tampón de bloqueo (BSA al 0.4 % (Sigma) (p/v) en PBS (Invitrogen)) durante la noche a 4 °C. Tras eliminar la solución de bloqueo, se incubaron sobrenadantes de hibridoma sin diluir en placas revestidas durante 30 minutos a TA. Las placas se lavaron una vez con PBST (Tween 20 al 0,02 %) (Sigma) (p/v en PBS), y a continuación se incubaron durante 30 minutos con Hu VISTA-Ig diluido hasta 100 ng/ml en tampón de bloqueo. Las placas se lavaron una vez con y se sondaron con anticuerpo de cabra dirigido contra Fc-HRP humano (Jackson N° 109-036-098) diluido 1:10,000 en tampón de bloqueo durante 30 minutos a TA. Se lavaron las placas de nuevo y se desarrollaron posteriormente utilizando 100 μ l/pocillo de sustrato TMB Turbo (Thermo Scientific 34022) incubando aproximadamente 10 minutos a TA. La reacción se detuvo utilizando 25 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 4N y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas automatizado.

Los hibridomas que se muestra que son reactivos a VISTA humano y de macaco tuvieron clonadas sus secuencias de anticuerpos de la región V. Células de Hibridoma se prepararon antes de las reacciones de la transcriptasa inversa (RT) con un sistema de células SuperScript III dirigido contra el sistema del ADNc. En resumen, se descartó el medio de cultivo y se colocó la placa en

hielo y se volvió a suspender en 200 µl de PBS frío. Cuarenta microlitros se transfirieron a una placa Reaction PCR MicroAmp fast PCR de 96 pocillos y la placa se colocó en una placa base metálica fría, se sellaron con película de plástico y se hicieron girar a 700 rpm durante 3 minutos se descartó el PBS y se añadieron a cada pocillo 10 µl de tampón de resuspensión y 1 µl de potenciador de la lisis. La placa se selló e incubó a 75 °C durante 10 min y se almacenó a -80 °C.

Para la reacción RT, cada pocillo contenía 5 µl de agua, 1.6 µl 10X Tampón de ADNasa, 1.2 µl de EDTA 50 mM, 2 µl de Oligo(dT)20 (50 mM) y 1 µl de 10 mM de mezcla de dNTP. La placa se incubó a 70°C durante 5 min. seguido por incubación en hielo durante 2 min, a continuación se añadieron los reactivos siguientes para cada pocillo; 6 µl 5X de tampón RT, 1µl de ARNasa™ (40 U/µl), 1 µl de SuperScript™ III RT (200 U/µl) y 1 µl de 0,1M de DTT. Se selló la placa y se colocó en un ciclador térmico precalentado a 50 °C y se incubó a 50 °C durante 50 minutos, seguido por inactivación (5 min de incubación a 85 °C), la reacción se enfrió en hielo y se almacenó el ADNc monocatenario a -80 °C hasta un uso adicional.

Para las amplificaciones de la región V, se prepararon 20 µl de reacciones de la PCR. Cada pocillo contenía 16.2 µl de agua, 2.0 µl 10X de tampón de reacción de la PCR, 0,8 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,4 µl de dNTP 10mM, 0,15 µl de mezcla de cebador directo 100 uM 0.05 µl de cebador inverso 100uM, 0.2 µl de enzima HiFi Tag. El ADNc, preparado tal como se ha descrito anteriormente, se transfirió (2 µl/pocillo) a la mezcla de componentes de la PCR, se selló la placa y se llevó a cabo una reacción de; para VH el programa fue (i) 94 °C durante 1 min (ii) 94 °C durante 15 s (iii) 55 °C durante 30 s (iv) 68 °C durante 1 min. Se repitieron las Etapas (ii – iv) durante un total de 35 ciclos seguido por una extensión final a 68 °C durante 3 min. Para el programa VL fue (i) 94 °C durante 1 min (ii) 94 °C durante 15 s (iii) 55 °C durante 30 s (iv) 65 °C durante 30 s, (v) 68 °C durante 1 min. Se repitieron las Etapas (ii – v) durante un total de 35 ciclos seguido por una extensión final a 68 °C durante 3 min.

Se premezclaron los cebadores directos y se utilizó dicha mezcla en una relación 3:1 con el cebador inverso. Se verificaron los productos de la PCR en un gel de agarosa Se prepararon las reacciones para la clonación de la fusión mediante la adición del potenciador (In-Fusion HC Cloning Kit, N° de Cat..

639650, Clontech). Se transfirieron cinco microlitros de la reacción de la PCR a una placa de PCR seguido por la transferencia de 2 µl de potenciador/pocillo. Se selló la placa y se incubó en un ciclador térmico (15 min a 37 °C y 15 min a 80 °C). Se preparó el vector de destino (vDR243 o vDR301) mediante la
5 digestión de Esp3I; (1.5µg de vector se digirieron es 3 µl de tampón Tango, 2 l de Esp3I y agua en una reacción de 30 µl a 37 °C durante 2 horas).

Para la clonación de la infusión, 2 µl del producto de la PCR tratado con potenciador se mezclaron con 100 ng de vector digerido con Esp3I y 2 µl de enzima de infusión 5X (Clontech). La reacción de infusión se llevó a cabo en un
10 formato de placas de la PCR de 96 pocillos. La placa se incubó durante 15 min a 50°C en un equipo de PCR y células competentes Stella se transformaron mediante choque térmico durante 40 segundos a 42°C sin agitar y se pulverizaron sobre placas de agar LB con antibiótico seleccionado y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se repicaron las colonias
15 en placas de 96 pocillos profundos que contenían medio LB/Carbenicilina haciéndolos crecer durante la noche a 37 °C. Se prepararon disoluciones madre congeladas de cultivos durante la noche mezclando con un volumen igual de glicerol al 30 % en p/v Se secuenciaron las regiones V utilizando un cebador de secuenciación SPF0052. Se analizaron las secuencias, Se
20 seleccionó un pocillo positivo por hibridoma de vH y vL, Se redispusieron en placas nuevas y se hicieron crecer durante la noche en medio rico con ampicilina. A continuación se prepararon clones de ADN miniprep para la transfección a pequeña escala en placas de 96 pocillos.

Se seleccionaron cuarenta y ocho secuencias de hibridoma de ratón
25 para que la cadena pesada y ligera se adaptara a un marco humano adaptado usando un programa de software interno. Se seleccionó un marco humano para cada una de las secuencias de ADN de la región V de vH o vL de ratón las secuencias de ADN de la región V se obtuvieron a través de una traducción posterior.. Las regiones de ADN sintético que correspondían a las secuencias
30 de aminoácidos HFA se ordenaron a partir de Tecnologías de ADN integradas (Coralville, IA). Se llevó a cabo la clonación en vDR149 y vDR157 precortados, IgG1 humana y kappa humana respectivamente.. Se usaron kits Qiagen Endo-free Maxi-prep para preparar el ADN. Se usaron cultivos Expi293 (100 ml) para expresar este panel de anticuerpos

EJEMPLO 5: Protocolo para el ensayo de supresión de linfocitos T VISTA-Ig *in vitro*

Células A20 de ratón se transfectaron de forma estable tanto con GFP como con VISTA humano. Se incubaron con el péptido OVA y con linfocitos T DO11.10. Se midió la expresión de CD25 por los linfocitos T 24 horas después que había comenzado la incubación. Las células A20-huVISTA suprimen la expresión de CD25 por los linfocitos T, pero esta lectura está significativamente restaurada por la incubación con VSTB95 (Figura 18).

EJEMPLO 6: ADAPTACIÓN DE REGIONES MARCO HUMANAS DE ANTICUERPOS ANTI-VISTA

Se adaptaron secuencias de hibridoma de ratón para la cadena pesada y ligera en un marco humano mediante el injerto de CDR (Jones, et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986) utilizando un programa de software interno. El programa delinea las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las secuencias de la región V de acuerdo con las definiciones de Kabat (Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970). *J Exp Med*, 132, 211-50) y compara las regiones marco con los genes de líneas germinales humanas usando Blast. Se seleccionó la línea germinal humana con la identidad de secuencia más elevada para los marcos de ratón como el gen aceptor para la adaptación del marco humano (HFA). En unos pocos casos, se seleccionaron, en su lugar, genes de líneas germinales humanas estrechamente relacionados, basándose en la experiencia anterior con marcos humanos bien expresados. Se obtuvieron secuencias de ADN de los marcos humanos seleccionados de cada una de las regiones vH o vL de ratón. Se obtuvieron regiones V mediante traducción inversa. Regiones de ADN sintético que correspondían a las secuencias de aminoácidos de HFA se solicitaron de DNA Technologies (Coralville, IA). Se llevó a cabo la clonación en la IgG1 humana y kappa humano, respectivamente.

EJEMPLO 7: Construcciones de anticuerpos Anti-Vista

Información de plásmidos y secuencias para las moléculas para el desarrollo de una línea celular: Se generaron construcciones de plásmidos para anticuerpos anti-VISTA que tenían regiones variables VSTB112 y regiones constantes de IgG1 κ (VSTB174, nuevo número debido a un cambio alotípico en la región constante), una región constante IgG2sigma (VSTB140) o una región constante resistente a la proteasa IgG1 (VSTB149).

Vectores Lonza

Se estableció el sistema de vectores de expresión pEE6.4 y pEE12.4 de ovario de hámster chino (CHO) (Lonza Biologics, PLC) en Biologics Research (BR) y Pharmaceutical Development & Manufacturing Sciences (PDMS) como el sistema de expresión principal para la generación de mAb en líneas celulares de expresión en mamíferos. Cada vector contiene un promotor de citomegalovirus (huCMV-MIE) para impulsar la expresión de la cadena pesada (HC) o la cadena ligera (LC) y contiene el gen de resistencia a la ampicilina. El vector pEE12.4 incluye también el gen que codifica la enzima glutamina sintetasa (GS). Las condiciones de crecimiento que requieren la actividad de la glutamina sintetasa coloca la presión selectiva en las células para mantener el vector de expresión (GS Gene Expression System Manual Version 4.0). Se usó pEE6.4 para clonar el gen HC y pEE12.4 para clonar el gen LC como vectores génicos individuales. Se ha creado el plásmido de doble gen Lonza a partir de estos vectores de genes Lonza individuales.

Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de mAb VISTA seleccionados

> cadena pesada de VSTB112 (SEC ID N°:37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE
WMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARS
SYGWSYEFDYWGQGTLLTVSS

> cadena pesada de VSTB50 (SEC ID N°:38)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGLNWVRQAPGQGLEWMGW
INPYTGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARE
GYGNYIFPYWGQGTLLTVSS

> cadena pesada de VSTB53 (SEC ID N°:39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTHYTIHWVRQAPGQGLEW
MGYIIPSSGYSEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGA
YDDYYDYAMDYWGQGTLLTVSS

> cadena pesada de VSTB95 (SEC ID N°:40)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYGMSWVRQAPGKGLE
WVASIISGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIY
DHDGDYYAMDYWGQGTLLTVSS

Secuencias de aminoácido de las regiones variables de cadena ligera de mAb de VISTA seleccionados

> cadena ligera de VSTB50 (SEC ID N°:41)

DIVMTQTPLSLSVTPGGQPASISCRASESVDTYANSLMHWYLQKPGQPP
QLLIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQTNEDPRT
FGQGTKLEIK

5 > cadena ligera de VSTB53 (SEC ID N°:42)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSP
QLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPWT
FGQGTKLEIK

> cadena ligera de VSTB95 (SEC ID N°:43)

10 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVP
WTFGQGTKLEIK

> cadena ligera de VSTB112 (SEC ID N°:44)

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIDTRLNHWYQQKPGKAPKLLIY
SASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSAYNPITFGQGT
KVEIK

> cadena ligera de VSTB116 (SEC ID N°:45)

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSINTNLNHWYQQKPGKAPKLLIY
AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQARDTPITFGQGT
KVEIK

EJEMPLO 8: Exploración por ELISA y FACS DE ANTICUERPOS ANTI-VISTA

Estos experimentos se efectuaron para determinar la capacidad de los anticuerpos producidos para unirse a proteínas VISTA de ser humano o macaco en un ELISA así como para determinar, usando exploración con FACS, la capacidad de los anticuerpos para unirse a la proteína VISTA en la superficie de células K562 (línea celular de leucemia mielógena humana) que expresan proteínas VISTA de ser humano o macaco.

Métodos:

30 Resumen del procedimiento ELISA: Las placas se revistieron durante la noche a 4°C con 1 µg/ml de proteínas SB0361 (human) o de SB0361 (cyno (macaco)), que son los dominios extracelulares de VISTA de las respectivas especies. Los anticuerpos se diluyeron a 1 µg/ml como concentración de partida con diluciones 1:4 escalonadas para un total de 4 concentraciones y se
35 incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas. Se utilizó un

anticuerpo de ratón dirigido contra IgG1 humana conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) para la detección, y se incubó durante 1 h a TA. Todos los lavados se realizaron usando PBS-Tween (0,05 %).

Resumen del procedimiento FACS: se tiñeron 2×10^5 células K562-G8 (humanas) o K562-C7 (cyno) con 5 µg/ml de cada anticuerpo de ensayo y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Se utilizó un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG1 humana conjugado con PE (ficoeritrina) como anticuerpo de detección secundario a 5 µg/ml. Las células se analizaron en un equipo BD Fortessa y se analizaron con el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc., Ashlang, OR) para determinar la MFI (intensidad de fluorescencia promedio) de la población viva.

Análisis de los datos/resultados: Para cada anticuerpo se otorgó una puntuación subjetiva (Sí/NO) relativo a si el anticuerpo se unía de manera robusta o no en ambos ensayos ELISA y FACS para cada uno de los 4 ensayos. Si un anticuerpo dio un resultado de "No" para la unión en cualquiera de los ensayos, esto se repitió para confirmar que era negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 7 siguiente y en las Figuras 19A-19F y 20A-20F.

Tabla 7.

Código INX	Hu ELISA	Cyno ELISA	Hu FACS	Cyno FACS
1	S	S	S	S
2	S	S	S	S
3	S	S	S	S
4	S	S	S	S
5	S	S	S	S
6	S	S	S	S
7	S	S	S	S
8	S	S	S	S
9	S	S	S	S
10	S	S	S	S
11	N	N	N	N
12	S	S	S	S
14	S	S	S	S
16	S	S	S	S
17	S	S	S	S

Código INX	Hu ELISA	Cyno ELISA	Hu FACS	Cyno FACS
18	S	S	S	S
19	S	S	S	S
20	S	S	S	S
21	S	S	S	S
22	S	S	S	S
23	N	N	N	N
24	N	N	N	N
25	S	S	S	S
26	N	S	N	S
28	S	S	S	S
30	N	N	N	N
31	N	N	N	N
32	N	N	N	N
33	S	S	S	S
34	S	S	S	S
35	S	S	S	S
36	S	S	S	S
37	S	S	S	S
38	S	S	S	S
39	S	S	N	N
40	S	S	S	S
41	S	S	S	S
42	S	S	S	S
43	S	S	S	S
44	S	S	S	S
45	S	S	S	S
46	S	S	S	S
47	S	S	S	S
48	S	S	S	S
49	S	S	S	S

EJEMPLO 9: Resultados de la exploración de anticuerpos anti-VISTA humano usando los ensayos de activación de la reacción mixta de linfocitos (MLR) y de Enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB)

El fin de este estudio era presentar datos que apoyasen la identificación de múltiples anticuerpos funcionales de α -VISTA que potenciasen las respuestas celulares inmunes en el ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR), así como en el ensayo de activación por enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB).

La reacción mixta de linfocitos (MLR) es un ensayo inmunológico estándar que depende del desemparejamiento de la clase I y II del CMH para dirigir una respuesta alogénica de los linfocitos T. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de dos individuos desemparejados, se incubaron juntas y como resultado de estos desemparejamientos, sucede la proliferación y la producción de citocinas.

Materiales y métodos:

Se preparó medio AB al 10% combinando 500 ml de RPMI con 50 ml de suero AB humano, 5 ml de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml), 5 ml de L-glutamina (100x) y 10 ml de HEPES (1 M). El medio se almacenó durante un máximo de 14 días. Se preparó timidina tritiada de 1 mCi diluyendo 0,2 ml de solución madre de timidina (1 mCi/ml) en 9,8 ml de RPMI.

Los anticuerpos de VISTA solubles se diluyeron a 20 μ g/ml en medio de suero AB al 10%. Se añadieron 100 μ l de las soluciones adecuadas de anticuerpo a los pocillos adecuados de una placa de 96 pocillos de fondo en U (Falcon, N° de producto 353077 o equivalente). Después de añadirse varias poblaciones celulares, la concentración final era 10 μ g/ml.

Aislamiento de los leucocitos: Los donantes tenían al menos 18 años de edad, estaban sanos en general y se seleccionaron al azar entre la población local. Se transfirió la sangre de los donantes de los tubos de aislamiento a tubos cónicos de 50 ml. Se pusieron en la parte inferior 15 ml de Ficoll 1077 por cada 25 ml de sangre con cuidado de no mezclarlo con la sangre. Se centrifugaron las células a 1250g durante 25 minutos a temperatura ambiente sin frenada. Los glóbulos blancos se aislaron en la interfase del Ficoll y el suero y las células se diluyeron en 40 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Se centrifugaron las células a 453g (1500 rpm) durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 50 ml de HBSS y se contaron

transfiriendo 500 μ l a un tubo separado.

Configuración de la reacción mixta de linfocitos (MLR) en placa de 96 pocillos: Se determinó el número aproximado de "células estimuladoras" y "células respondedoras" necesario para el ensayo basándose en el número de muestras que se iba a analizar. La población estimuladora se sembró a $0,5 \times 10^5$ células/pocillo y la población respondedora se sembró a $1,0 \times 10^5$ células/pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se pipeteó el número adecuado de "células estimuladoras" en un nuevo tubo cónico y se centrifugó como se ha descrito anteriormente. Se resuspendieron las células en 10 ml y se irradiaron con 4000 rad. Las células se centrifugaron tal como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 /ml en medio de suero AB al 10 % se añadieron en 50 μ l a los pocillos adecuados. Se aisló el número necesario de células respondedoras y se centrifugaron tal como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 /ml en medio de suero AB al 10 % y se añadieron en 50 μ l a los pocillos adecuados. Las células se incubaron durante 5 días a 37°C y CO₂ al 5 %. El quinto día, se retiraron 30 μ l de sobrenadante para el análisis de interferón gamma (producción de IFN- γ). El quinto día, se añadieron 25 μ l de una solución de timidina tritiada 40 μ Ci/ml a cada pocillo y se incubó durante 8 horas a 37°C y CO₂ al 5 %. Las células se transfirieron a una placa de microcentelleo de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se contaron usando el contador de microcentelleo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de IFN- γ se determinó mediante ELISA (eBioscience N° de Cat. 88-7316-88) usando el protocolo del fabricante.

Análisis de los datos: Se calcularon las cuentas por minuto (CPM) o la concentración de IFN- γ promedio para los pocillos no tratados. Se calcularon las CPM o el IFN- γ para cada uno de los grupos de ensayo. Transformación Log₁₀ del conjunto de datos. Usando puntuaciones de 12 veces MLR para cada compuesto, se calculó la media para el conjunto de 12 grupos de ensayo de cada puntuación media de compuesto para 12 experimentos = $\Sigma [(\log_{10} (\text{CPM media de triplicado por compuesto de ensayo})) - (\log_{10} (\text{CPM media de triplicado para la muestra sin tratamiento}))]/12$.

Criterios de aceptación: Todos los reactivos de ensayo y controles adecuados se sometieron a ensayo para determinar endotoxinas antes de

ejecutar el ensayo y obtuvieron niveles de $< 0,1$ EU/mg. Las células respondedoras solas tuvieron recuentos de CPM por debajo de 700 CPM de media, indicando que las células estaban quiescentes cuando se incubaron solas. Las CPM para el grupo de MLR fueron al menos 2 veces mayores que las CPM para células respondedoras incubadas solas, lo que indica que había sucedido una reacción y que los donantes son discordantes. Todos los ensayos de MLR incluyeron una proteína de control negativo de IgG1 humana. Los resultados del control negativo de IgG1 humana no fueron diferentes estadísticamente de las muestras no tratadas, basándose en el uso de una prueba de la t de Student.

Exploración de anticuerpos anti-VISTA en el MLR: Exploración inicial de todos los compuestos. Antes de ejecutar el MLR con los anticuerpos anti-VISTA, se confirmó que los anticuerpos se unían tanto a VISTA unido a células a través de análisis FACS y a proteína VISTA mediante ELISA. Los anticuerpos S26 (VSTB77), S30 (VSTB86), S31 (VSTB88), S32 (VSTB90) y S39 (VSTB74) no superaron esta exploración inicial, pero se usaron igualmente en el ensayo. Para los fines de la exploración inicial, se ensayaron todos los anticuerpos a $10 \mu\text{g/ml}$ en el MLR midiéndose los parámetros de proliferación e $\text{IFN-}\gamma$ (Figuras 21A-21D y 22A-22B).

Selección de los seis anticuerpos principales. A partir de la exploración inicial, se seleccionaron seis candidatos para análisis adicionales: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

Estudios de dilución de los seis mejores candidatos en el MLR: Ajustes de protocolo. El protocolo es idéntico al descrito anteriormente con el ajuste de los anticuerpos, que se diluyeron a las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 y $0 \mu\text{g/ml}$.

Determinación de valores de CI_{50} : Se usaron los recuentos de CPM en bruto y las concentraciones de $\text{IFN-}\gamma$ para determinar la CI_{50} para cada uno de los anticuerpos. Los cálculos de la CI_{50} se determinaron mediante el uso del programa "EZ-R stats". Se usaron seis respondedores individuales para determinar los valores de CI_{50} , los recuentos de CPM individuales y las concentraciones de $\text{IFN-}\gamma$ en el MLR con titulaciones de dosis de los candidatos principales.

Tabla 8: Valores de CI_{50} para CPM e IFN- γ en el MLR

	VSTB112 (S2)	VSTB116 (S5)	VSTB95 (S16)	VSTB50 (S41)	VSTB53 (S43)	VSTB60 (S47)
CPM	-0,67	-0,78	-0,54	-0,12	-0,33	0,02
Gamma	-0,42	-0,16	0,22	0,06	0,27	0,4

** Los valores se muestran como $\log_{10}$ de las concentraciones de anticuerpo.

Conclusión: La exploración inicial indicó que múltiples anticuerpos
5 específicos de VISTA eran capaces de potencial la respuesta inmunitaria
celular de MLR. Los anticuerpos se clasificaron basándose en su eficacia y
varianza, según estos resultados, VSTB112, VSTB116, VSTB95, VSTB50,
VSTB53 y VSTB60 se seleccionaron para evaluarlos en experimentos de
aumento escalonado de dosis. VSTB60 indujo una respuesta más débil que los
10 otros cinco anticuerpos en los experimentos de aumento escalonado de dosis.

Ensayo de activación por enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB): SEB
es un súper-antígeno bacteriano que induce la activación de linfocitos T $V\beta+$.
Las células mononucleadas de sangre periférica se aislaron e incubaron con
antígeno SEB en cultivo, lo que indujo una producción robusta de citocinas.
15 Este ensayo se llevó a cabo en cinco candidatos principales.

La preparación del medio AB al 10%, la preparación de timidina tritiada
de 1 mCi, la preparación de anticuerpos solubles de VISTA, y el aislamiento de
los glóbulos blancos se llevaron a cabo tal como se describe anteriormente en
el MLR.

20 Configuración de placa de 96 pocillos de SEB: Se determinó el número
adecuado de células respondedoras necesario para el ensayo basándose en el
número de muestras que se iba a analizar. La población respondedora se
siembra a $2,0 \times 10^5$ células/pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U.
Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las células se
25 centrifugaron tal como se describió anteriormente y se resuspendieron a una
concentración de 4×10^6 /ml en medio de suero AB al 10% y se añadieron 50 μ l
a los pocillos adecuados. Se añadieron 50 μ l de medio de suero AB al 10% que
contenía el antígeno SEB a una concentración de 40 ng/ml. En los
experimentos descritos, se obtuvo SEB de Sigma Aldrich (Nº de Cat. S0812).
30 La concentración final en el pocillo fue a 10 ng/ml. Las células se incubaron
durante 3 días a 37°C y CO_2 al 5%. En el tercer día, se retiraron 30 μ l del

sobrenadante para el análisis de producción de IFN- γ . Se añadieron 25 μ l de una solución de timidina tritiada de 1 mCi/ml a cada pocillo y se incubó durante 8 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Las células se transfirieron a la placa de microcentelleo de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se

5 contaron usando el contador de microcentelleo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de IFN- γ mediante ELISA (eBioscience N° de Cat 88-7316-88) usando el protocolo del fabricante.

Protocolo: Análisis de los datos. Se calcularon los recuentos por minuto (CPM) o la concentración de IFN- γ promedio para cada uno de los anticuerpos

10 a todas las concentraciones. Los criterios de aceptación se llevaron a cabo tal como se describe anteriormente. La determinación de los valores de CI₅₀ se llevó a cabo del modo descrito. Recuentos de CPM individuales y concentraciones de IFN- γ en el ensayo de SEB con titulaciones de dosis de los candidatos principales.

15 Tabla 9: Valores de CI₅₀ tanto de CPM como IFN- γ en SEB

	VSTB112 (S2)	VSTB116 (S5)	VSTB95 (S16)	VSTB50 (S41)	VSTB53 (S43)	VSTB60 (S47)
CPM	-1,16	-1,44	-1,12	-0,74	-1,06	no realizado
Gamma	-1,24	-0,35	0,05	1,69	-1,05	no realizado

** Los valores se muestran como log₁₀ de las concentraciones de anticuerpo.

Conclusiones: Los anticuerpos específicos de VISTA potenciaron la producción de citocinas y la proliferación de manera dependiente de la dosis en

20 el ensayo de SEB. Los valores de CI₅₀ del estudio de SEB fueron generalmente similares a los resultados de los estudios de dilución de MLR.

EJEMPLO 10: ENSAYO DE UNIÓN A EPÍTOPO

Métodos: Se usó el sistema ProteOn XPR36 (BioRad) para llevar a cabo la unión a epítipo. Se recubrieron microplacas ProteOn GLC (BioRad, N° de

25 Cat 176-5011) con dos conjuntos de 6 anticuerpos monoclonales (mAb) usando las instrucciones del fabricante para la química de acoplamiento de amina (BioRad, N° de Cat 176-2410).

Los mAb competidores se preincubaron en exceso (concentración final de 250 nM) con VISTA humano (concentración final de 25 nM) durante 4 horas

30 a temperatura ambiente y se ejecutaron 6 a la vez en la microplaca recubierta con los paneles de mAb con un tiempo de asociación de 4 minutos seguido de

disociación durante 5 minutos. Después de cada ejecución, se regeneró la microplaca con ácido fosfórico 100 mM.

El análisis de los datos implicó agrupar todos los sensogramas por ligando y aplicar un asistente de alineamiento, que efectúa automáticamente el
5 alineamiento de los ejes X e Y, y la retirada de ruidos. Se aplicó entonces una corrección Interspot a los datos.

Se definió que un mAb no competitivo tenía una señal de unión igual o > que la señal A1 (solo unión a VISTA humano).

Se definió que un mAb competitivo tenía una señal de unión << que la
10 señal A1 (es decir, solo unión a VISTA humano).

Resultados: En el sensograma de ejemplo mostrado en la Figura 23, el anticuerpo VSTB85 se recubrió sobre la microplaca Proteon SPR y la proteína VISTA preincubada con los competidores indicados se ejecutó sobre el chip. VSTB50 es un ejemplo de anticuerpo no competitivo, ya que se observó una
15 respuesta positiva cuando se ejecutó el complejo VISTA/VSTB50. GG8, VSTB49 y VSTB51 complejados con VISTA no se unieron al VSTB85 recubierto sobre la microplaca y por lo tanto se clasificaron como competidores por el mismo sitio de unión en VISTA que VSTB85.

Tabla 10:

		Conjunto de muestra N° 1: acoplado al sensor						Conjunto de muestra N° 2: acoplado a sensor					
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Muestras	Grupo	GG8	B85	B95	B104	B112	B113	B50	B53	B66	B67	IE8	B116
GG8	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB100.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB101.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB102.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB103.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB104.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB105.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB106.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB107.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB108.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB109.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB110.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB111.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB112.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB113.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB114.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB115.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB116.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S

		Conjunto de muestra N° 1: acoplado al sensor						Conjunto de muestra N° 2: acoplado a sensor					
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
VSTB49.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB51.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB53.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB59.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB65.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB67.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB70.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB81.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB92.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB95.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB97.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB98.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB99.001	1	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S
VSTB50.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB54.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB56.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB60.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB63.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB66.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB73.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB76.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB78.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB84.001	2	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
VSTB85.001	3	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	I	S
VSTB74.001	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
IE8	5	S	I	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S

mAb inmovilizado sobre el sensor

S = sí compite (señal << que A1- solo VISTA humano)

N = no compite (señal > que A1- solo VISTA humano)

I = Indeterminado (señal similar a A1-solo VISTA humano)

Ejemplo 11: Determinación de la afinidad según ProteOn

Los anticuerpos se capturaron en microplacas ProteOn usando superficies recubiertas de Fc anti-IgG. Se ensayó la unión de los anticuerpos a dominios extracelulares (ECD) de VISTA de humano y de cynomolgus (cyno) a concentraciones de proteínas VISTA en el intervalo de 0,39 nM a 100 nM. Se dejó que los antígenos se uniesen/asociasen a las microplacas recubiertas de anticuerpo durante 4 minutos, tras los cuales se controló la disociación durante 30 minutos. Las microplacas se regeneraron con dos tratamientos de ácido fosfórico 100 mM durante 18 segundos. Todos los experimentos se ejecutaron a 25°C y los datos se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir de 1:1.

EJEMPLO 12: EFECTOS DEL TRATAMIENTO ANTI-VISTA EN UN MODELO DE TUMOR DE VEJIGA MURINO MB49

Métodos:

Se inyectó a ratones C57Bl/6 con células tumorales MB49. Una vez que
5 se habían establecido los tumores, se inició el tratamiento anti-VISTA. Entonces se controló el crecimiento tumoral 3 veces/semana. Se eutanasió a los ratones, de acuerdo con las regulaciones de IACUC, una vez los tumores habían alcanzado 15 mm en cualquier dimensión.

Para cada experimento, se descongeló un vial congelado de células
10 MB49 y se crecieron en RPMI 1640 (+ L-Glut) con suero al 10% y antibióticos de penicilina/estreptomicina. Después de tres días en cultivo, se recogieron las células usando acutasa StemPro y se resuspendieron en RPMI a una concentración de 5×10^6 células/ml y se inyectaron 50 μ l por ratón.

Se compraron ratones C57Bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad al
15 Instituto Nacional del Cáncer. Tras la llegada, se les dejó aclimatarse durante un día antes afeitarles sus lados derechos y de tatuárseles las colas. Entonces se les inyectó de tres a cinco días después.

Inyección del tumor (intradérmica): Se inyectó a los ratones por vía
intradérmica (i.d.) en su lado afeitado con 50 μ l de suspensión de células MB49
20 (~250.000 células).

Control del crecimiento tumoral: El crecimiento tumoral se midió usando
calibres electrónicos primeramente a lo largo de su dimensión más amplia (L) y
después en un ángulo de 90° respecto de la primera medida (W). El volumen
tumoral se derivó del modo siguiente:

25
$$\text{Volumen} = (L^2 \cdot W^2)/2$$

Se consideró que los tumores estaban establecidos una vez alcanzaron
~5mm de diámetro (volumen de ~60 mm³). Una vez establecidos, se inició el
tratamiento. El crecimiento tumoral se midió tres veces por semana durante el
trascuro del tratamiento y hasta que terminó el experimento.

30 Tratamiento anti-VISTA: Se inyectó por vía intraperitoneal el anticuerpo monoclonal 13F3-mIgG2a quimerizado a 10 mg/kg. Las pautas de inyección fueron tres veces a la semana durante cuatro semanas.

Eutanasia de los ratones: Según las regulaciones de IACUC, se
eutanasió a los animales una vez que sus tumores alcanzaron 15mm en su
35 dimensión más larga.

Análisis de la eficacia: Los volúmenes tumorales de los ratones se analizaron usando Excel para el control de los datos, GraphPad Prism para las gráficas. El análisis estadístico se llevó a cabo usando una macro para el programa de cálculo estadístico R.

5 El diseño experimental se muestra en la Figura 24.

Resultados:

El tratamiento con Ch13F3-mlgG2a en ratones hembra condujo al rechazo completo del tumor (CR) en el 70 % de los animales y la remisión parcial (PR) en el 30 % (n=7) (Tabla 13 y Figura 25B). Por el contrario, todos
10 los ratones de control tratados con mlgG2a mostraron un crecimiento progresivo de los tumores (6/6)(Figura 25A). Estos datos demuestran que el tratamiento con anti-VISTA tiene un importante efecto sobre el crecimiento tumoral.

15 Tabla 11: Remisión completa (CR) comparada con la remisión parcial (PR)

	Hembras 13F3 IgG2a (n=7)
CR	5
PR	2 hasta día 32

La secuencia de VISTA humano se muestran en las Figuras 26 y 27, adaptadas de Wang et al., 2011, *anteriormente citado*, cuyo contenido se ha incorporado en su totalidad al presente documento.

20 EJEMPLO 13: Cartografía del epítipo de los anticuerpos anti-VISTA usando estudios de intercambio hidrógeno/deuterio (H/D)

Para identificar los epítipos de VSTB50, 60, 95 y 112 en VISTA humano, se llevó a cabo espectrometría de masas con intercambio hidrógeno/deuterio (HDX-MS) usando los correspondientes Fab. Para el
25 intercambio H/D, los procedimientos utilizados para analizar la perturbación de Fab fueron similares a los descritos anteriormente (Hamuro *et al.*, J. Biomol. Techniques 14:171–182, 2003; Horn *et al.*, Biochemistry 45:8488-8498, 2006) con algunas modificaciones. Los Fab se prepararon a partir de IgG mediante digestión con papaína y captura de Proteína A usando el kit de preparación
30 Pierce Fab (Thermo Scientific, N° de Cat..44985). La secuencia de la proteína VISTA humana contiene seis sitios de glicosilación unidos a N. Para mejorar la cobertura de la secuencia, la proteína se deglicosiló con PNGasa F. La

proteína VISTA deglicosilada se incubó en una solución de agua deuterada durante tiempos predeterminados que dan como resultado la incorporación de deuterio en los átomos de hidrógeno intercambiables. La proteína VISTA deuterada formó un complejo con uno Fab cualquiera de VSTB50, VSTB60, VSTB95 o VSTB112 en 46 μ l de óxido de deuterio (D_2O) a 4 °C durante 30 s, 2 min, 10 min y 60 min. La reacción de intercambio se desactivo con pH bajo y las proteínas se digirieron con pepsina. Se realizó un seguimiento de los niveles de deuterio en los péptidos identificados a partir del desplazamiento de masas observado en el LC-MS. Como control de referencia, la proteína VISTA se procesó de forma similar, salvo que no formó un complejo con las moléculas Fab. Se infirió que las regiones unidas a Fab eran aquellos sitios relativamente protegidos del intercambio y, de esta manera, que contenían una fracción más alta de deuterio que la proteína VISTA. Se pudo cartografiar aproximadamente el 94 % de la proteína para péptidos específicos.

Los mapas de perturbación HDX-MS para VISTA con VSTB50 / VSTB60, y VSTB95 / VSTB112 se muestran en la Figura 28, parte superior e inferior, respectivamente. Se identificaron dos grupos de epítomos. El anti-VISTA VSTB50 reconoce el mismo epítopo que VSTB60; VSTB95 se une a otra región de epítopo diferente a VSTB112 en VISTA. Los anti-VISTA VSTB50 y 60 comparten el mismo epítopo que comprende los segmentos, $_{103}NLTLDSGL_{111}$ (SEC ID N°:62), y $_{136}VQTGKDAPSNC_{146}$ (SEC ID N°:63) (Figura 28 parte superior). Los anti-VISTA VSTB95 y 112 parecen dirigirse a epítomos similares, que comprende los segmentos $_{27}PVDKGHDVTF_{36}$ (SEC ID N°:75), y $_{54}RRPIRNLTFQDL_{65}$ (SEC ID N°:65) (Figura 28 parte inferior). Hay otros dos segmentos que muestran una perturbación débil por VSTB95 y 112, incluyendo los restos 39-52 y 118-134. Sin embargo, Los niveles de la reducción no son tan fuertes como en las regiones anteriores (27-36 y 54-65) en el mapa de diferencias. Aunque un péptido, $_{100}TMR_{102}$ que muestra fuerte perturbación mediante VSTB95 y 112, está situado en la otra cara de la superficie de VISTA, está lejos de las regiones de epítopo, 27-36 y 54-65. Esta perturbación podría deberse a un efecto alostérico. Estos resultados de HDX-MS proporcionan los epítomos según péptido para los anticuerpos anti-VISTA. No se observó regiones de epítopo solapantes entre ambos grupos de epítomos. Estos resultados concuerdan con los datos anteriores de unión con competición en que no compiten entre sí.

EJEMPLO 14: Determinación de la estructura del complejo VISTA
ECD:VSTB112 Fab humano mediante cristalografía de proteínas

En un esfuerzo para determinar la estructura de VISTA y para delinear el
eCD y el paratopo que definen la interacción entre el dominio extracelular
5 (ECD) de VISTA y el fragmento Fab del anticuerpo principal VSTB112, el
complejo se cristalizó y se determinó su estructura a una resolución de 1,85 Å.
La estructura de la ECD de VISTA humano en complejo con el fragmento Fab
del anticuerpo VSTB112 se determinó en un esfuerzo tanto para determinar la
estructura de la ECD de VISTA propiamente dicha como para definir el
10 epítipo/paratopo de su interacción. La estructura revela que VISTA adopta un
pliegue IgV con una topología de cadena similar a la de la cadena TCR Vα.
Además del enlace disulfuro habitual que une las hebras B y F en las caras
posteriores y delanteras del β-sándwich, la estructura revela que la ECD tiene
dos enlaces disulfuro adicionales, uno para unir el bucle CC' a la lámina
15 delantera y un segundo entre las hebras A' y G'. Aunque están presentes
contactos de cristal entre las moléculas VISTA, son poco importantes y no hay
evidencia de un dímero de las EDC de VISTA basándose en su estructura. Se
muestra que el epítipo de VSTB112 comprende las partes de los bucles BC,
CC' y FG de VISTA junto con los restos de la lámina beta delantera (C'CFG)
20 más cercanos a estos bucles. El paratopo está fuertemente desviado hacia las
interacciones de la cadena pesada con CDR L3 haciendo un contacto mínimo.

Epítipo/paratopo que define la interacción VISTA:VSTB112

El Fab de VSTB112 entierra un área superficial de 1024,3 Å² tras su
unión a la ECD de VISTA, donde el enterramiento de la superficie de la cadena
25 pesada representa 715,3 Å² de este total. Se forman siete enlaces de
hidrógeno y 4 interacciones de puente salino entre VISTA la cadena ligera de
VSTB112 y 10 enlaces de hidrógeno y 2 interacciones de puente salino entre
VISTA y la cadena pesada de VSTB112. VSTB112 reconoce restos en la
lámina delantera de las hebras C', C, F, y G en los extremos cercanos al bucle
30 FG así como los restos en los bucles BC, FG, y CC' (Figuras 29 y 30). Las
interacciones con el bucle CC' representan la mayoría de los contactos con la
cadena ligera de Fab, donde solamente los restos E125 y R127 del bucle FG
realizan interacciones adicionales con la cadena ligera. Los restos 119 a 127
correspondientes al bucle FG de VISTA representan el 38 % del área
35 superficial total 1034,8 Å² de área superficial enterrada tras la unión con

VSTB112. Notablemente, este bucle es fuertemente polar, comprendido por la siguiente secuencia –IRHHHSEHR- (SEC ID N°:76). Además, W103 en la H3 de la CDR de VSTB112 se empaqueta estupendamente contra la estructura principal de los restos H122 y H123 de vista, y H121 de VISTA conforma un
5 borde sobre la interacción con el anillo aromático de F55 en H2 de la CDR.

En la Figura 31 se muestra una comparación entre las regiones de epítipo identificadas mediante cristalografía y HDX.

EJEMPLO 15: ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y MONOCITOS MEDIANTE ANTICUERPOS ANTI-VISTA

10 El efecto funcional de los anticuerpos anti-VISTA se evaluó en dos ensayos *in vitro*, reacción de leucocitos mixta (MLR) y SEB (*Staphylococcus* enterotoxina B). Ambos ensayos miden la proliferación de linfocitos T y la inducción de citocinas como lecturas primarias, pero estos efectos se deben a
15 mecanismos diferentes. En la MLR, Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de dos donantes humanos diferentes se incubaron juntas, y el emparejamiento incorrecto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) entre los linfocitos T de un donante y las células dendríticas del otro donante dio como resultado la producción de linfocitos T y la producción de interferón (IFN γ). En el ensayo SEB, las PBMC de un solo
20 donante se incubaron con un superantígeno bacteriano, que se une directamente a la proteína MHC de clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC) al receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T, que producen la activación y proliferación de linfocitos T, y la secreción de citocinas. En ambos ensayos, VSTB112, que es la molécula
25 progenitora de VSTB174, demostró una inducción dependiente de la dosis de la proliferación de linfocitos T y producción de citocinas, y fue el más potente de los candidatos (Figuras 21A-21D, Tabla 12).

Tabla 12. Valores CE₅₀ para las lecturas del ensayo MLR. VSTB112 (progenitor de VSTB174) fue la molécula más potente.

Candidato	CE ₅₀ proliferación (μg/ml)	CE ₅₀ producción de IFN γ (μg/ml)
VSTB112	0,21	0,38
VSTB116	0,17	0,69
VSTB95	0,29	1,67
VSTB50	0,77	1,14
VSTB53	0,47	1,88
VSTB60	1,04	2,48

Ensayos de activación de monocitos

Los datos del ensayo, mostrados en la Tabla 12, se generaron con VSTB112, la molécula progenitora de VSTB174. Para comprender mejor la actividad de VSTB174, se llevó a cabo un ensayo de activación de monocitos. Los resultados mostraron que la incubación de VSTB174 con PBMC completas indujo una regulación en exceso de los marcadores de activación (CD80 y HLA-DR) en monocitos CD14+, lo que indica un efecto de la unión del anticuerpo a un subconjunto de células inmunes conocido por expresar elevados niveles de VISTA (Figura 32). Una pregunta adicional es si los efectos sobre la activación de monocitos de las PBMC completas podría facilitarse mediante cualquier anticuerpo que se una a VISTA y tenga una Fc de IgG1. Los anticuerpos VSTB103 y VSTB63 se unen a VISTA con alta afinidad (KD 6,36E-10 y 8,30E-10 respectivamente) y a células que expresan la proteína VISTA, similar a VSTB112 y VSTB111. VSTB103 se encuentra en el mismo epítipo de unión que VSTB112, mientras que VSTB63 se encuentra en un epítipo de unión diferente; ninguno de los anticuerpos facilita la activación de monocitos. En su conjunto, estos resultados muestran que un mecanismo por el cual VSTB174 puede ejercer su efecto sobre la activación/proliferación de linfocitos T es mediante la activación de monocitos facilitada por las células NK.

Preparación de los medios

500 ml de RPMI 1640 (Corning, 10-040-CV) se combinaron con 50 ml de suero AB humano (Valley Biomedical, Inc, n1 de lote 3C0405), 5 ml de penicilina/estreptomicina (Lonza, 17-602E) 10.000 U/ml, 5 ml de L-glutamina (100x) (Gibco, 25030-081) y 10 ml de HEPES (1M) (Fisher BP299-100, Lote N° 1). Los medios se almacenaron durante un periodo no superior a 14 días a 4°C.

Preparación de VISTA soluble y anticuerpos de control

Los anticuerpos se diluyeron a 2X la concentración deseada en medio suero AB al 10 %: VSTB174: lote VSTB174.003

Se añadieron 100 µl de las soluciones de anticuerpo deseadas a los pocillos adecuados de una placa de 96 pocillos de fondo en U (Falcon, 353077). Tras añadir las diferentes poblaciones celulares en 100 µl, la concentración final de cada anticuerpo fue 1, 0,1 o 0,01 g/ml. El anticuerpo de control IgG1 CNTO 3930 (Lote 6405, ENDO <0,1 UE/mg) se añadió a una concentración final de 1 µg/ml.

Las PBMC se aislaron

Los donantes tenían como mínimo 18 años de edad, generalmente sanos y seleccionados aleatoriamente entre la población local.

La sangre de los donantes se transfirió del tubo de aislamiento a tubos
5 cónicos de 50 ml.

15 ml de Ficoll 1077 (SIGMA, 10771) se extendieron por debajo con mucho cuidado para no mezclarlo con la sangre. Esto se realizó para 25 ml de sangre.

Las células se centrifugaron a 1250 g durante 25 minutos a temperatura
10 ambiente sin freno.

Los leucocitos se aislaron en la interfase de Ficoll y el suero y las células se diluyeron en 40 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS).

Las células se centrifugaron a 453 g (1500 rpm) durante 10 minutos a 4 °C.

15 Las células se resuspendieron en 50 ml de HBSS y se contaron transfiriendo 500 l a un tubo eppendorf independiente.

Además, se utilizó un kit de aislamiento Pan Monocyte de Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Nº de Cat. 130-096-537) para aislar células CD14+ mediante selección negativa en varios grupos de
20 tratamiento.

Configuración de cultivo *in vitro*

El número aproximado de células necesarias se determinó para el ensayo en función del número de muestras a analizar. La población de tratamiento se sembró a $2,0 \times 10^5$ células/pocillo de una placa de 96 pocillos de
25 fondo en U. Para la población CD14 seleccionada negativamente, se sembraron $0,5 \times 10^5$ células. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Las células se centrifugaron tal como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 /ml para la población PBMC
30 completa y $0,5 \times 10^6$ /ml para la población CD14 seleccionada negativamente en medio suero AB al 10 % y se añadieron 100 l de anticuerpo de ensayo a los pocillos adecuados llevando el volumen total de cada pocillo a 200 l.

Las células se incubaron durante 1, 2, o 3 días a 37° C y CO₂ al 5 %.

Tinción de anticuerpos y citometría de flujo

35 La placa de 96 pocillos de fondo en U se centrifugó durante 5 minutos a

453 g y se eliminó el sobrenadante.

Las células se lavaron con 200 µl de PBS y se centrifugaron como en la etapa 5.5.1.

El sobrenadante se descartó y se resuspendió en 50 µl de PBS que
5 contenía los siguientes anticuerpos:

- CD14-APC (clon HCD14) 1:250 (Biolegend N° de Cat..325608)
- HLA-DR-PE Cy7 (clon L243) 1:250 (Biolegend N° de Cat.. 307616)
- CD80-PE (clon 2D10) 1:250 (Biolegend N° de Cat.. 305208)
- inhibidor de unión Hu FcR (eBioscience N° de Cat.. 14-9161-73)

10 Se incubó durante 20 minutos sobre hielo húmedo en la oscuridad.

Se añadieron 150 µl de PBS y se centrifugó como en la etapa 5.5.1.

Se añadieron 150 µl de tampón PBS y se analizó mediante FACS.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Miltenyi
MACSQuant de 10 parámetros y se analizaron usando FlowJo 9.7.5 para
15 determinar la expresión de HLA-DR yd CD80 en la población CD14+. La media
geométrica de la intensidad de fluorescencia (MFI), una estadística que define
la tendencia central de un conjunto de números, se utilizó como la estadística
definitoria para comparar los tratamientos.

Análisis estadístico

20 Todas las estadísticas se llevaron a cabo en Prism GraphPad, Versión 6.
Las comparaciones emparejadas entre los grupos se realizaron para cada uno
de los puntos temporales usando un ANOVA monolateral con corrección de
Tukey para la multiplicidad. Valores p inferiores a 0,05 para todos los ensayos y
comparaciones se consideraron significativos. Para todos los gráficos y tablas,
25 *: p<0,05, **: p<0,01; ***: p<0,001; p<0,0001.

EJEMPLO 16: ACTIVIDADES ADCC Y ADCP DE LOS ANTICUERPOS
ANTI-VISTA

VSTB174 tiene una Fc de IgG1, que puede transmitir citotoxicidad
mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y fagocitosis mediada
30 por células dependiente de anticuerpo (ADCP). Ambos tipos de ensayos se
realizaron y mostraron que VSTB174 podía lisar o fagocitar células K562-
VISTA (Figuras 33-34), pero no las células progenitoras de la línea celular
K562 de mieloma (no se muestran los datos). Un mecanismo de acción
adicional de VSTB174 para modular la acción inhibidora de VISTA puede ser la
35 lisis y destrucción de células que expresan niveles elevados de VISTA,

eliminándolas del microambiente local.

EJEMPLO 17: ACTIVIDADES ADCP DE ANTICUERPOS ANTI-VISTA ADICIONALES

Se utilizó un ensayo de fagocitosis *in vitro* para estudiar la potenciación de la fagocitosis mediada por macrófagos de células que expresaban ectópicamente VISTA mediante mAb dirigidos contra VISTA humano (VSTB173 y VSTB174). Estos mAb se clonaron en diferentes estructuras principales FC (IgG1 WT (natural), IgG1 PR (resistente a proteasa), e IgG2 σ) y que supuestamente podrían tener diferentes actividades con respecto a la potenciación de la fagocitosis. Las estructuras principales de IgG1 y IgG1 PR pueden unirse a los receptores de Fc y tener el potencial de causar ADCP, mientras que IgG2 σ no se une a los receptores Fc y no debería mediar en ADCP.

Los anticuerpos anti-VISTA se ensayaron en ensayos ADCP con células diana K562 progenitora y K562-VISTA. Como se muestra en las Figuras 35-36, VSTB174, VSTB149, VSTB173 y VSTB145 potenciaron la fagocitosis de hMac en células K562-VISTA. Los anticuerpos VISTA VSTB140 o VSTB132, con el Fc de IgG2 σ que no se une a los receptores de Fc, no potenció la fagocitosis tal como se esperaba. Los mAb de VISTA VSTB174 y VSTB173 con Fc de IgG1 mostraron una fagocitosis más sólida que VSTB149 y VSTB145 con Fc de IgG1PR (véanse las Tablas 13 y 14 para los valores de CE₅₀).

Tabla 13. Valores de CE₅₀ de mAb dirigidos contra VISTA humano.

Tratamiento	VSTB174	VSTB149	VSTB140
CE ₅₀	0,0782	0,1142	NA

Tabla 14. Valores de CE₅₀ de mAb dirigidos contra VISTA humano.

Tratamiento	VSTB173	VSTB145	VSTB132
CE ₅₀	0,0146	0,1075	NA

VSTB174 y VSTB173 mostraron una débil potenciación de la fagocitosis de células progenitoras K562 a la concentración más alta (Figuras 35-36), que puede ser debido a la baja expresión de VISTA en las células K562. El resto de anticuerpos anti-VISTA no potenciaron la fagocitosis de las células K562.

Cada uno de los anticuerpos del control negativo se ensayaron a dos concentraciones diferentes en el ensayo de fagocitosis K562-VISTA, pero no

indujeron fagocitosis. Este resultado indica que la fagocitosis mediada por los anticuerpos anti-VISTA es específica y se debe a la expresión del antígeno VISTA por las células K562-VISTA.

EJEMPLO 18: ACTIVIDADES ADCC DE ANTICUERPOS ANTI-VISTA
5 ADICIONALES

Para ensayar su capacidad para inducir ADCC, se ensayaron los tres siguientes anti anti-VISTA humano:

- VSTB174 (IgG1)
- VSTB149 (IgG1 PR)
- 10 VSTB174.LF (IgG1 LF (bajo en fucosa)).

Cada anticuerpo se ensayó a seis concentraciones diferentes en la misma placa, por triplicado en dos experimentos independientes para un total de seis puntos de datos.

- VSTB174, VSTB149, y VSTB174.LF demostraron, cada uno de ellos,
- 15 actividad ADCC que se podía medir a 10, 1, 0,1 y 0,01 µg/ml, mientras que solamente el anticuerpo LF demostró actividad ADCC que se podía medir a 0,001 µg/ml; ninguno de los anticuerpos demostró ADCC a 0,0001 µg/ml. Puesto que cada uno de estos anticuerpos tiene una IgG1 o una Fc variante de IgG1, este resultado era esperado. El anticuerpo LF demostró un aumento en
- 20 la potencia ADCC como se pone de manifiesto por el valor CE₅₀ más pequeño de la curva del anticuerpo LF (0,002293 µg/ml) cuando se compara con la curva del anticuerpo normal IgG1 (0,02381 µg/ml). La curva del anticuerpo PR de IgG1 tiene un valor de CE₅₀ similar al de la curva IgG1 normal (0,01846 µg/ml).

25

Tabla 15. Valores CE₅₀ (µg/ml) de los tres anticuerpos anti-VISTA ensayados según se determina mediante análisis ADCC.

Anticuerpo anti-VISTA	CE ₅₀ (µg/ml)
VSTB174 (IgG1)	0,02381
VSTB149 (IgG1 PR)	0,01846
VSTB174.LF (IgG1 LF)	0,002293

- Todos los anticuerpos IgG1 humana, IgG1 PR humana y IgG1 LF
- 30 humana mostraron una destrucción mediada por ADCC que se podía medir a

las concentraciones de 10, 1, 0,1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo, mientras que solamente el anticuerpo LF mostró destrucción para una concentración de anticuerpo de 0,001 $\mu\text{g/ml}$. Ninguno de los anticuerpos anti-VISTA mostró destrucción para una concentración de anticuerpo de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$.

- 5 El anticuerpo LF mostró una destrucción ADCC aproximadamente 10 veces más potente que cualquiera del anticuerpo IgG1 normal o al anticuerpo IgG1 PR, como se desprende de los valores de CE50.

EJEMPLO 19: AFINIDAD DE VSTB174 PARA VISTA DE SER HUMANO Y DE MACACO

- 10 La afinidad de VSTB174 por el dominio extracelular (ECD) de VISTA de ser humano y de macaco se determinó por métodos de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento ProteOn. VSTB174 mostró valores de KD muy similares para cada proteína, 1,56E-10 M para ECD de VISTA humano y 8,66E-11 M para VISTA de MACACO.

- 15 EJEMPLO 20: LOS ANTICUERPOS DE VISTA MUESTRAN EFICACIA EN MODELOS DE TUMOR MURINO

Cepas de ratón, reactivos y modelos tumorales

- 20 Para los estudios *in vivo*, se utilizaron ratones en los que se había introducido al secuencia de VISTA humano (VISTA-KI) retrocruzados sobre un fondo C57Bl/6.

Se generó un anticuerpo dirigido contra VISTA humano para permitir ensayos en los ratones VISTA-KI, usando la región variable VSTB174 injertada en el Fc IgG2a (VSTB123) de ratón.

Se evaluó el cáncer de próstata MB49 en los ratones VISTA KI.

- 25 Además de los estudios publicados que demostraban que un tratamiento con anticuerpos anti-VISTA inhibe el crecimiento tumoral en ratones silvestres (Le Mercier et al., 2014), la eficacia antitumoral se ha demostrado con el anticuerpo derivado de hámster en ratones wt usando calendarios de dosificación diferentes, así como el ratón VISTA-KI tratado con VSTB123.

- 30 Estudios de eficacia *in Vivo* en el modelo tumoral MB49 en ratones VISTA-KI

- Los estudios de eficacia en MB49 se llevaron a cabo en ratones VISTA-KI hembra, ensayando VSTB123 a varias dosis en el intervalo 1- 10 mg/kg. Los ratones recibieron una inyección intradérmica con 250.000 células tumorales MB49 el día 0. En el día 6, comenzó la dosificación como se indica en la Figura
- 35

37 (bien 10 mg/kg del control de isotipo mlgG2a, o las dosis indicadas de VSTB123; 10 ratones/grupo).

VSTB123 fue más eficaz a dosis elevadas, en comparación con dosis inferiores, como se muestra en la Figura 37. Las dosis de 10 mg/kg y de 7,5
5 mg/kg fueron equivalentes, mientras que los tumores crecieron más rápidamente en los ratones que recibieron una dosis de 5 o 1 mg/kg.

EJEMPLO 21: DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VISTA EN TUMORES HUMANOS CON ANTICUERPOS ANTI-VISTA

La Figura 1 muestra la expresión de VISTA en una línea celular tumoral
10 AML —esta, y los datos de expresión de la secuencia de ARN de la Figura 17 respaldan la idea de que VISTA se expresa en células AML y que un fármaco anti-VISTA sería eficaz si se dirigiera directamente contra estas células para su modulación inmune o destrucción mediada por anticuerpos.

Los datos para evaluar la expresión de VISTA en cáncer de pulmón se
15 obtuvo a partir de muestras de tumor de pulmón procedente de resecciones quirúrgicas. Las células se disociaron y se caracterizaron para determinar la expresión de VISTA y otros muchos marcadores. Los resultados mostraron que 13/13 tumores de pulmón (espinocelulares o adenocarcinomas) contienen CD14+ VISTA+ células mieloides, (Figura 38).

20 EJEMPLO 22: DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VISTA EN TUMORES DE PULMÓN USANDO ANTICUERPOS ANTI-VISTA

Se desarrolló un ensayo inmunohistoquímico usando el clon GG8, una IgG1 de ratón dirigida contra VISTA humano. Este mAb se utilizó para investigar la tinción de VISTA en secciones tumorales FFPE de cáncer de
25 pulmón no microcítico (NSCLC).

Las secciones tumorales FFPE se trataron con métodos convencionales de recuperación de antígenos antes de la tinción. El anticuerpo GG8 de ratón dirigido contra VISTA humano se utilizó con una dilución 1:500. La unión de GG8 se detectó usando un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IgG
30 de ratón, seguido por un HRP polimérico dirigido contra IgG de conejo. Siguió contratinción con hematoxilina, a continuación se puntuaron las secciones tumorales.

La expresión de VISTA en cáncer de pulmón quedó principalmente restringida al infiltrado inmune (el ejemplo se muestra en la Figura 39) y se
35 encontraron elevados niveles de células positivas para VISTA en muchas

muestras de cáncer de pulmón.

EJEMPLO 23: Estructura del DOMINIO EXTRACELULAR (ECD) de VISTA humano en un complejo con el fragmento Fab de vstb174

Se generaron variantes del antígeno VISTA que se purificaron mediante
5 cristalografía. El Fab VSTB174 recombinante marcado con his se expresó internamente y se purificó. Se generaron cristales, que se utilizaron para recoger datos de alta resolución del complejo VISTA ECD:Fab VSTB174 usando radiación de sincrotrón y la determinación estructural se resolvió usando combinaciones de modelado por homología y análisis de densidad
10 electrónica (Figura 29 (parte superior)).

La estructura del complejo VISTA ECD:Fab VSTB174 se determinó mediante cristalografía de rayos X para una resolución de 1,85 Å, proporcionando la primera estructura de ECD de VISTA y delineando el epítipo y paratopo de VSTB174. El ECD de VISTA adopta un plegado IgV con una
15 topología similar a ECD de CTLA-4, pero tiene una sola hebra G' que se extiende desde la lámina delantera del β-sándwich. A' y G' se unieron adicionalmente por vía química mediante un puente disulfuro formado entre los restos C12 de la hebra A' y el C146 de la hebra G'. Se descubrió que seis
20 cisteínas encajaban en tres puentes disulfuro intramoleculares, y, en función de los contactos del cristal, no hay evidencia de un VISTA dimérico.

VSTB174 reconoce restos en la lámina delantera de las hebras C', C, F, y G en los extremos cercanos al bucle FG así como los restos en los bucles BC, FG, y CC'.

Las enseñanzas de todas las patentes, solicitudes publicadas y
25 referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito de manera particular con referencias a realizaciones de ejemplo de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden efectuarse varios cambios en la forma y
30 detalles de la misma sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región de unión a antígeno que se une a un supresor del dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA), donde la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a VISTA modula o potencia una respuesta inmune.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde el fragmento de anticuerpo es un Fab, F(ab')₂, o fragmento de anticuerpo scFv.
3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región constante de anticuerpo.
4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde VISTA se expresa en una célula hematopoyética.
5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde la célula hematopoyética es una célula de linaje mieloide y/o un linfocito.
6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde la célula hematopoyética es un monocito o neutrófilo.
7. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde la célula hematopoyética es un linfocito T.
8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde la célula hematopoyética es un linfocito B, un linfocito citotóxico natural (NK) o un linfocito T citotóxico natural (NKT).
9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde VISTA se expresa en una tumoral.
10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 donde VISTA se expresa en el microambiente de un tumor (TME).

11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y una o más CDR de la cadena ligera; donde el una o más CDR de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N^o: 1-3, 7-9, 13-15, 19-21, 25-27, 31-33 y una o más CDR de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N^o: 4-6, 10-12, 16-18, 22-24, 28-30, 34-36).
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además una cadena pesada y al menos una cadena ligera.
13. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende la SEC ID N^o: 1-3.
14. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena ligera comprende la SEC ID N^o: 4-6.
15. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende la SEC ID N^o: 1-3 y donde al menos una cadena ligera comprende la SEC ID N^o: 4-6.
16. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada mostrada en la SEC ID N^o: 37-40.
17. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena ligera comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada mostrada en la SEC ID N^o: 41-45.
18. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada mostrada en la SEC ID N^o: 37-40, y donde al menos una cadena ligera comprende la secuencia de la región variable de la

cadena pesada mostrada en la SEC ID N°: 41-45.

19. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5

20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

10 21. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el anticuerpo comprende una región humana constante.

15 22. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la molécula de anticuerpo es específica de un epítipo incluido en la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 46.

20 23. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el anticuerpo se une a un epítipo de VISTA con una afinidad de al menos 1×10^{-9} litro/mol.

25 24. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el anticuerpo se une a un epítipo de VISTA con una afinidad de al menos 1×10^{-8} litro/mol.

25 25. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el anticuerpo se une a un epítipo de VISTA con una afinidad de al menos 1×10^{-7} litro/mol.

30 26. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la modulación de la respuesta inmune comprende un aumento de los leucocitos CD45+, CD4+ linfocitos T, o linfocitos T CD8+, o una combinación de los mismos, o una disminución en las células inmunes que expresan VISTA.

35

27. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la modulación de la respuesta inmune comprende una producción potenciada de citocinas, respuesta potenciada de los linfocitos T, y/o modula la expresión de Foxp3.

5

28. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10

29. Una composición que comprende:

un antagonista de VISTA que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región de unión a antígeno que se une a un supresor del dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA); y

15

una vacuna.

30. Una composición farmacéutica que comprende:

un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región de unión a antígeno que se une a un supresor del dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA); y

20

una vacuna,

donde la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a VISTA modula o potencia una respuesta inmune.

25

31. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27.

30

32. Un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar al individuo una cantidad eficaz de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 28-30.

33. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita que comprende:

5 administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un supresor del dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA; donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a VISTA, modulando o potenciando de esta forma una respuesta inmune contra el cáncer.

10 34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31-32, donde el individuo es un mamífero.

35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31-32, donde el individuo es un ser humano.

15 36. Un método para tratar el cáncer en un individuo que lo necesita que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un supresor del dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA; donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a VISTA, modulando o potenciando de esta forma una respuesta inmune contra el cáncer.

20 37. El método de la reivindicación 36, donde el cáncer es una leucemia, linfoma, síndrome mielodisplásico o mieloma, o una combinación de los mismos.

38. El método de la reivindicación 37, donde la leucemia es una leucemia linfocítica o una leucemia mielógena.

30 39. El método de la reivindicación 37, donde la leucemia es leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (mielógena) (AML), leucemia mielógena crónica (CML); leucemia de células pilosas, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular extendida, o leucemia de linfocitos T adultos.

35

40. El método de la reivindicación 36, donde el cáncer es una leucemia mieloide (mielógena) aguda (AML).
- 5 41. El método de la reivindicación 36, donde el cáncer es una leucemia mielógena crónica (AML).
42. El método de la reivindicación 36, donde el cáncer es un tumor sólido.
- 10 43. El método de la reivindicación 36, donde el tumor sólido está rodeado por un estroma tumoral que comprende células mieloides, linfocitos T, o una combinación de células mieloides y linfocitos T.
- 15 44. El método de la reivindicación 42 o 43, donde el tumor sólido está infiltrado con células mieloides, linfocitos T o una combinación de células mieloides y linfocitos T.
45. El método de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente administrar una vacuna.
- 20 46. Un método para suprimir el crecimiento del cáncer en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo eficaz de las reivindicaciones 1-27 a un sujeto que lo necesita.
- 25 47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31-46, donde la composición, anticuerpo o fragmento se administra por vía parenteral o no parenteral, por ejemplo, intravenosa, subcutánea u oral.
- 30 48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31-46, donde la dosificación de la composición administrada, anticuerpo o fragmento administrados es de 1-15 mg/kg por administración.
- 35 49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31-46, donde la composición, anticuerpo o fragmento se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, o una vez cada tres meses.

50. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a VISTA y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°:1, una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 2 y una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 3, y que comprende además un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la SEC ID NO: 4 una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N°:5 y una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEC ID N°:6.

51. Un anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 12, donde el dominio VL variable de cadena ligera comprende una región marco humana.

52. Un anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo completo.

53. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.

54. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 51 unido de manera operativa a un promotor.

55. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la reivindicación 52.

56. Un método para producir un anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método cultivar células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 53 en condiciones para producir dicho anticuerpo o fragmento.

57. El método de acuerdo con la reivindicación 54 que comprende además aislar dicho anticuerpo.

58. Un artículo de fabricación que comprende la composición de la reivindicación 30 y un recipiente, y que comprende además un prospecto o etiqueta que indica que la composición se puede usar para tratar el cáncer.

5 59. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, donde el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

10 60. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y una o más CDR de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionados entre el grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

15

61. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41),
20 VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

62. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende las tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112
25 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

63. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena ligera comprende las tres CDR de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2),
30 VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

64. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende las tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112
35

(S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47), y donde al menos una cadena ligera comprende las tres CDR de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

65. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

66. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

67. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde al menos una cadena pesada comprende la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47), y donde al menos una cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) y VSTB60 (S47).

68. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita que comprende:
administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un supresor del dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA; donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a VISTA, modulando o potenciando de esta forma una respuesta inmune contra el cáncer; y

administrando un segundo tratamiento contra el cáncer.

69. El método de la reivindicación 68, donde el segundo tratamiento contra el
cáncer es cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica, tratamiento
5 dirigido, o tratamiento inmunomodulador, o una combinación de los mismos.

70. La composición de la reivindicación 29, la composición farmacéutica de la
reivindicación 30, o el método de la reivindicación 45, donde la vacuna es una
vacuna de vector vírico, vacuna bacteriana, vacuna de ADN, vacuna de ARN,
10 vacuna peptídica, o vacuna de proteína.

71. El método de la reivindicación 36, donde el cáncer es un cáncer de
pulmón.

15 72. El método de la reivindicación 69, donde el cáncer es carcinoma de
pulmón no microcítico (NSCLC).

73. Un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo del mismo que
comprende una región de unión a antígeno que se une a un supresor del
dominio V de Ig para activación de linfocitos T (VISTA), donde el anticuerpo
20 comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1 de VH que
tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:25, una CDR2 de VH que
tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:26 y una CDR3 de VH
que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la
SEC ID N°: 27, y que comprende además un dominio VL de anticuerpo que
25 comprende CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
N°:28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
N°: 29 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
N°:30.

30 74. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 73, que
comprende una o más regiones marco humanizadas o humanas.

75. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 74, donde el
35 dominio VH de anticuerpo comprende la SEC ID N°:37.

76. El anticuerpo de la reivindicación 74 o 75, donde el dominio VL de anticuerpo comprende la SEC ID N°:44.

5 77. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 73-76, donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada.

10 78. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 77, donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de cadena pesada humana.

15 79. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 77 o 78, donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1.

20 80. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 79, donde la región constante de cadena pesada IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 presente en la SEC ID N°:61.

25 81. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 79, donde la región constante de cadena pesada de IgG1 se ha modificado para mejorar la resistencia a la proteasa del anticuerpo.

30 82. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 81, donde la región constante de cadena pesada IgG1 que se ha modificado para mejorar la resistencia a la proteasa del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 presente en la SEC ID N°:60.

83. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 77-82, donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera.

35 84. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 83, donde la

región constante de la cadena ligera es una región constante de cadena ligera humana.

- 5 85. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 84, donde la región constante de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera presente en la SEC ID N°:56.
- 10 86. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 73-85, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEC ID N°:60 y una cadena ligera que comprende la SEC ID N°:56.
- 15 87. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 73-85, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEC ID N°:61 y una cadena ligera que comprende la SEC ID N°:56.
- 20 88. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 73-87, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se expresa en una célula que es deficiente en enzimas de fucosilación.
- 25 89. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 88, donde la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 30 90. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 73-89 y un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente, o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 35 91. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 73-89, o la composición de la reivindicación 90.
92. El método de la reivindicación 91, donde el cáncer es un cáncer de

pulmón.

93. El método de la reivindicación 91 o 92, que comprende además administrar un segundo tratamiento contra el cáncer.

5

94. El método de la reivindicación 93, donde el segundo tratamiento contra el cáncer es cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica, tratamiento dirigido, o tratamiento inmunomodulador, o una combinación de los mismos.

10 95. Un método para tratar un carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 73-89, o la composición de la reivindicación 90.

15

96. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 22, donde el epítipo es un epítipo conformacional.

20 97. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 96, donde el epítipo conformacional comprende o está presente dentro de los restos 103-111 (NLTLDSGL (SEC ID N°:62)) y 136-146 (VQTGKDAPSNC (SEC ID N°:63)) de VISTA humano (SEC ID N°:46).

25 98. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 96, donde el epítipo conformacional comprende o está presente dentro de los restos 24-36 (LLGPVDKGHDVTF (SEC ID N°:64)), y 54-65 (RRPIRNLTFQDL (SEC ID N°:65)) de VISTA humano (SEC ID N°:46).

30 99. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 96, donde el epítipo conformacional comprende los restos de aminoácidos en el bucle FG de VISTA humano (SEC ID N°:46).

35 100. Un método para potenciar una respuesta inmune en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al dominio V de la Ig

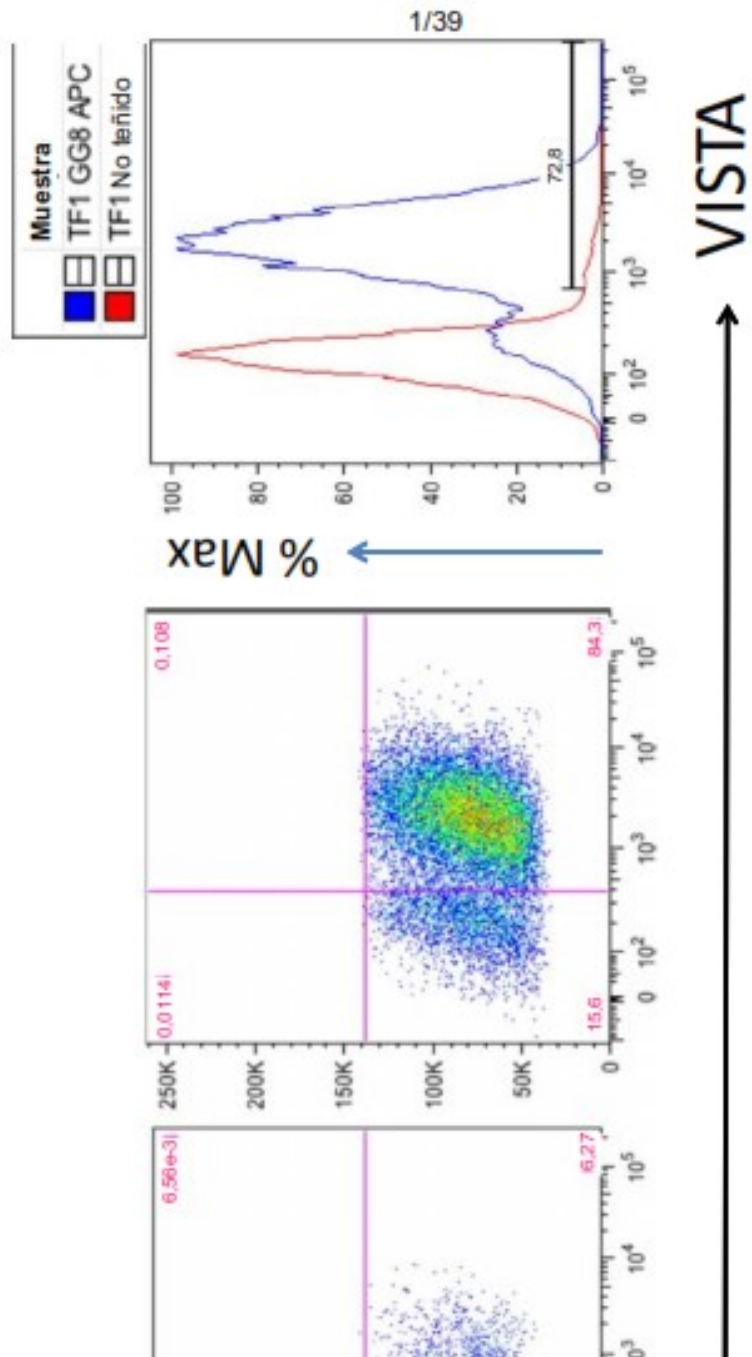
supresora de la activación de los linfocitos T (VISTA), o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA, potenciando por tanto una respuesta inmune al cáncer.

- 5 101. El método de reivindicación 100, donde la respuesta inmune es una respuesta inmune antitumoral.
- 10 102. Un método para desencadenar una respuesta biológica en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une al dominio V de la Ig supresora de la activación de los linfocitos T (VISTA), o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende una región de unión a antígeno que se une a VISTA, potenciando de esta forma una respuesta inmune contra el cáncer, donde la respuesta biológica se selecciona entre el grupo que consiste
- 15 en:
- a. activación de monocitos;
 - b. inducción de la proliferación de linfocitos T y secreción de las citocinas;
 - c. aumento en la supervivencia de monocitos;
 - 20 d. inducción de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en células que expresan VISTA; y
 - e. inducción de una fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) en células que expresan VISTA.
- 25 103. Un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo del mismo que inhibe de forma competitiva el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación dirigido contra VISTA humano (SEC ID N°:46).

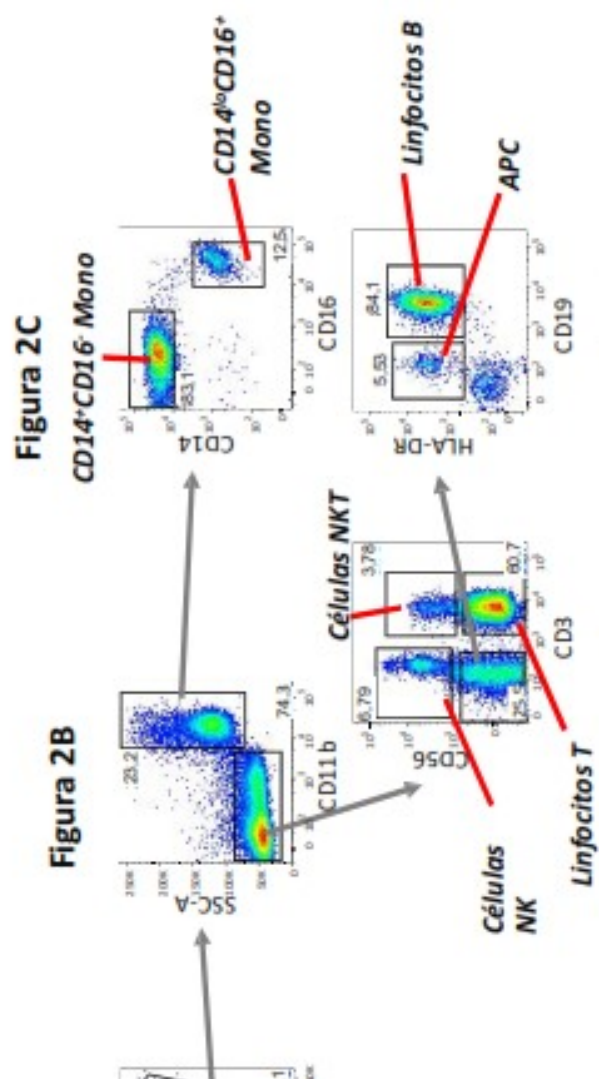
RESUMEN

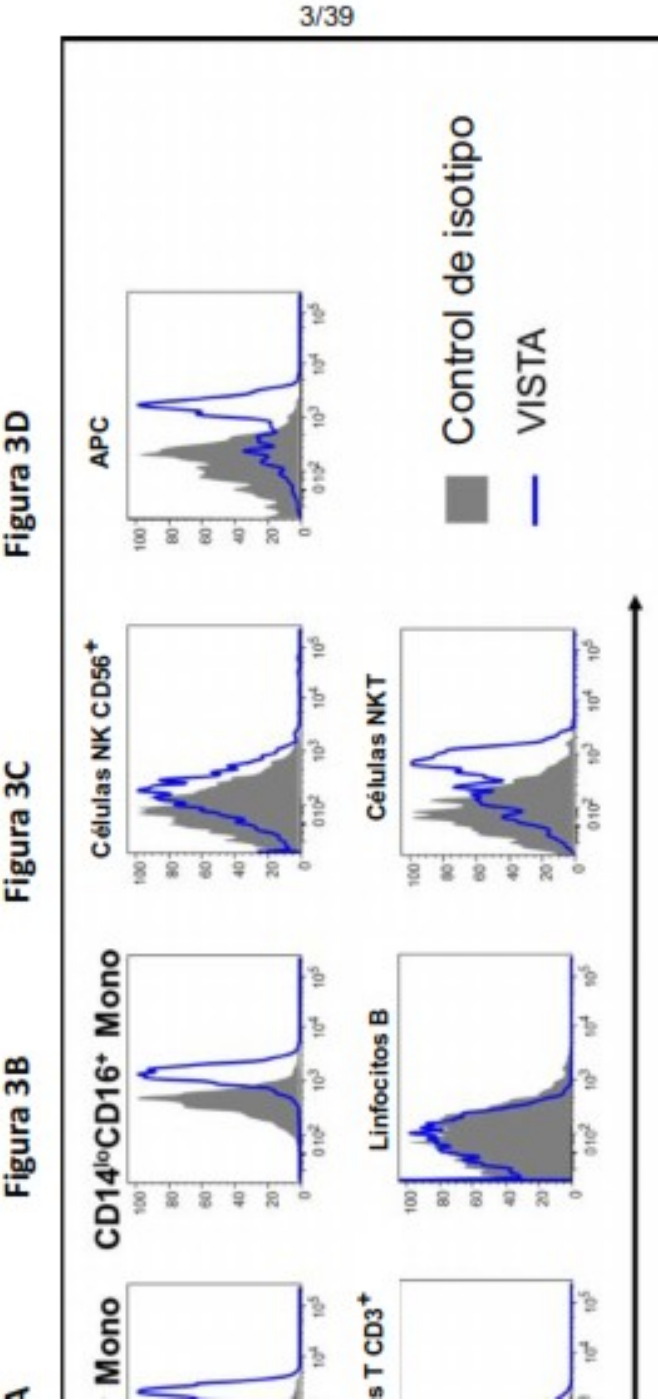
ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS ANTI-VISTA

- 5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos y fragmentos que se unen al dominio V de la Ig supresora de la activación de linfocitos T (VISTA), y métodos para preparar y usar los mismos. Los métodos de uso incluyen métodos de tratamiento del cáncer, incluyendo leucemias, linfomas, tumores sólidos y melanomas.

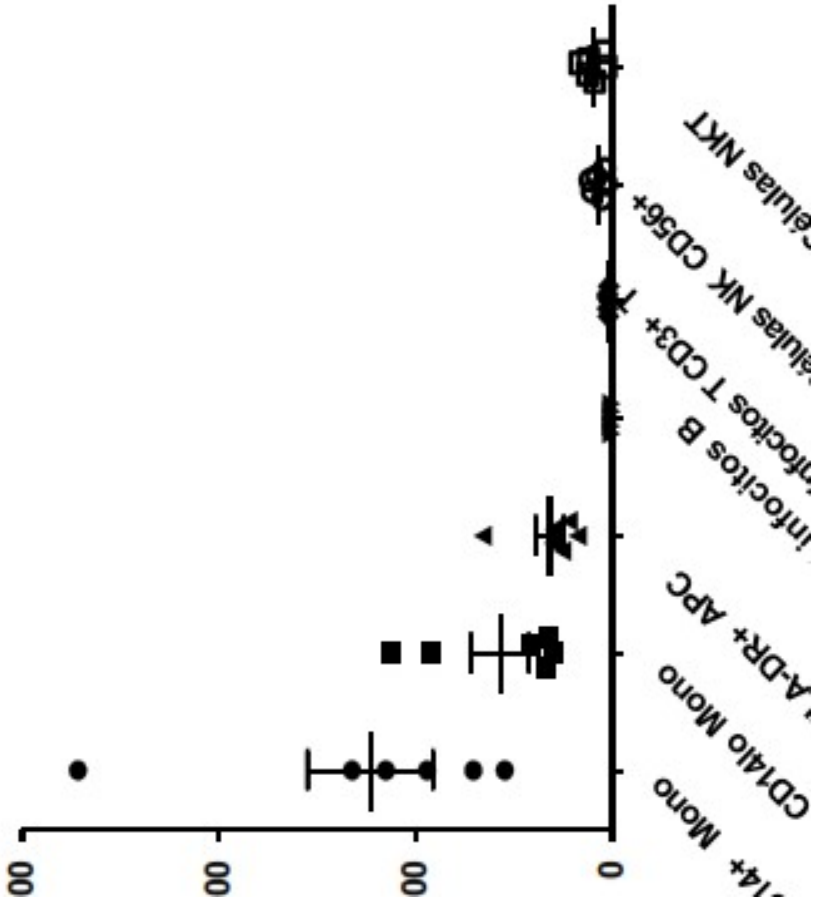


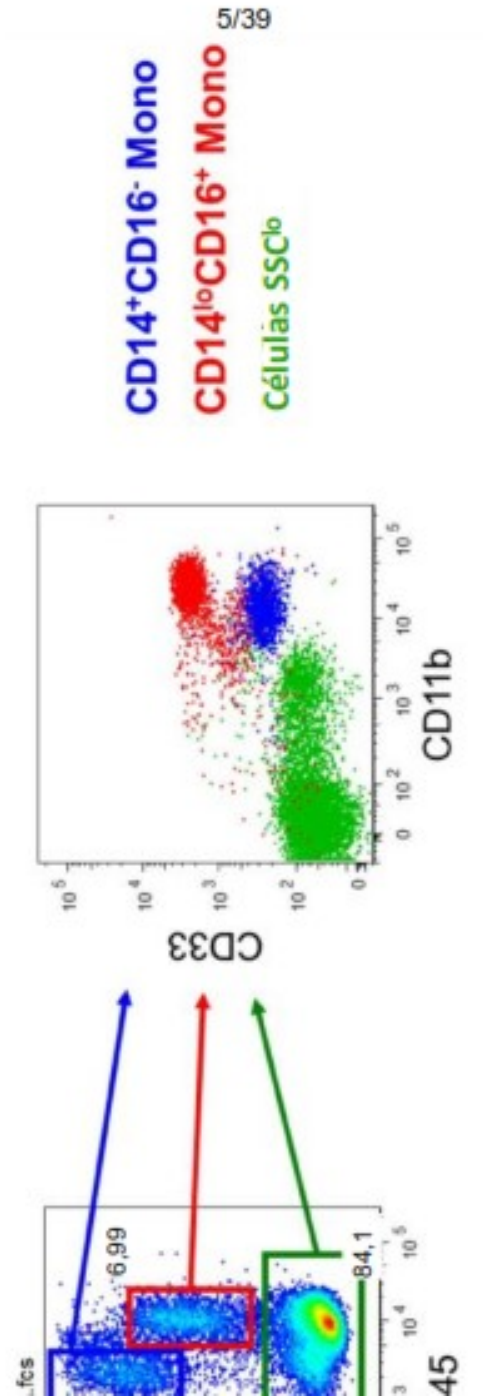
2/39





4/39





6/39

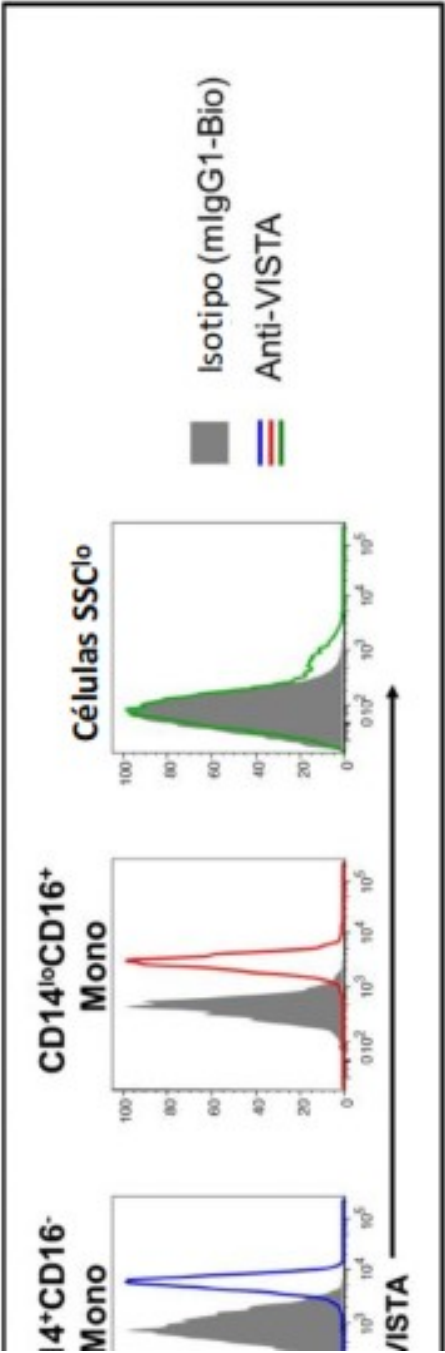


Figura 7D

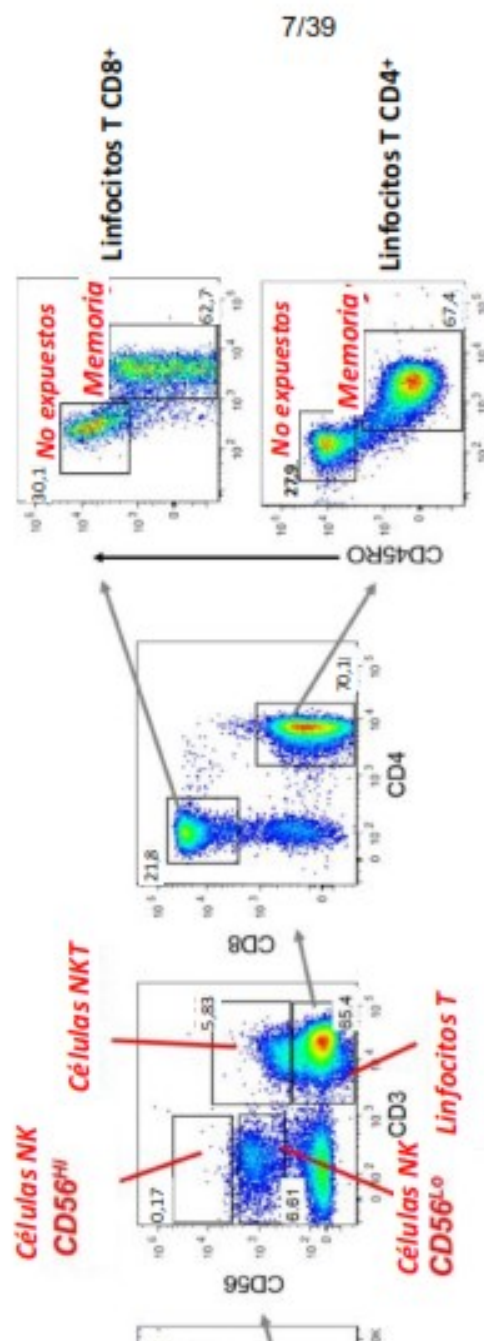
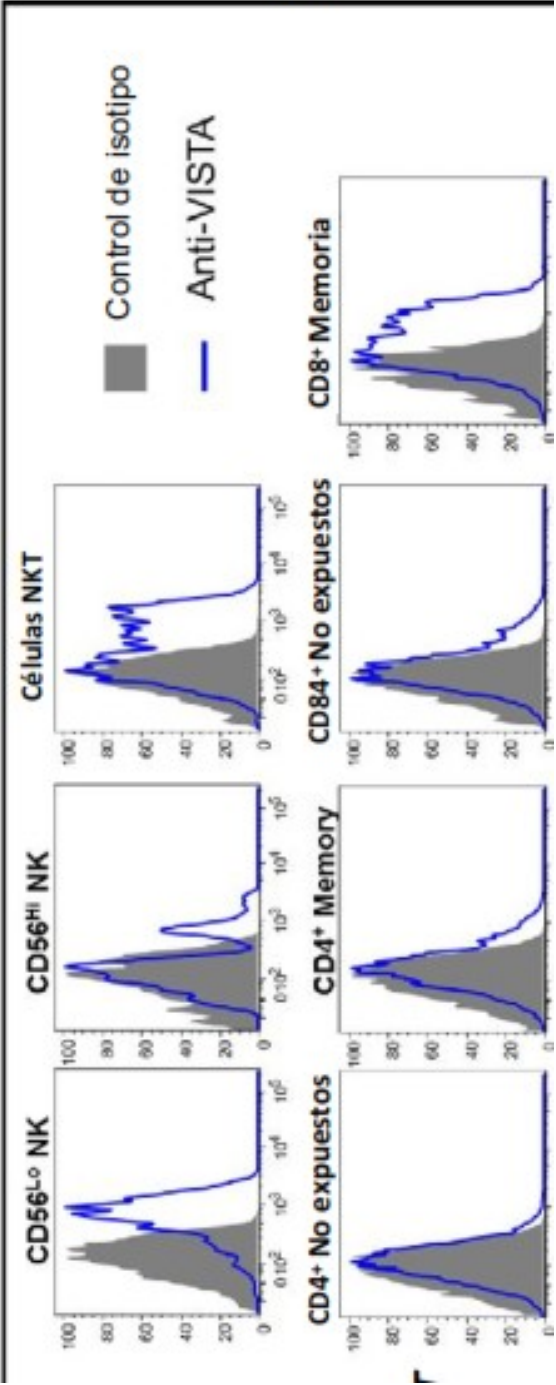


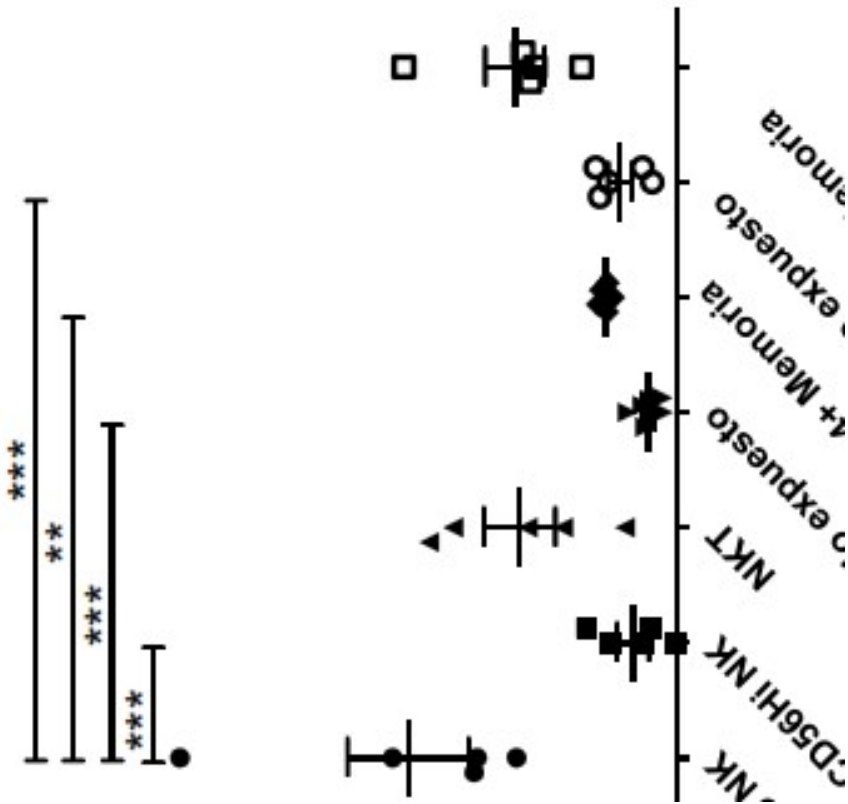
Figura 8C

Figura 8B

Figura 8A



9/39



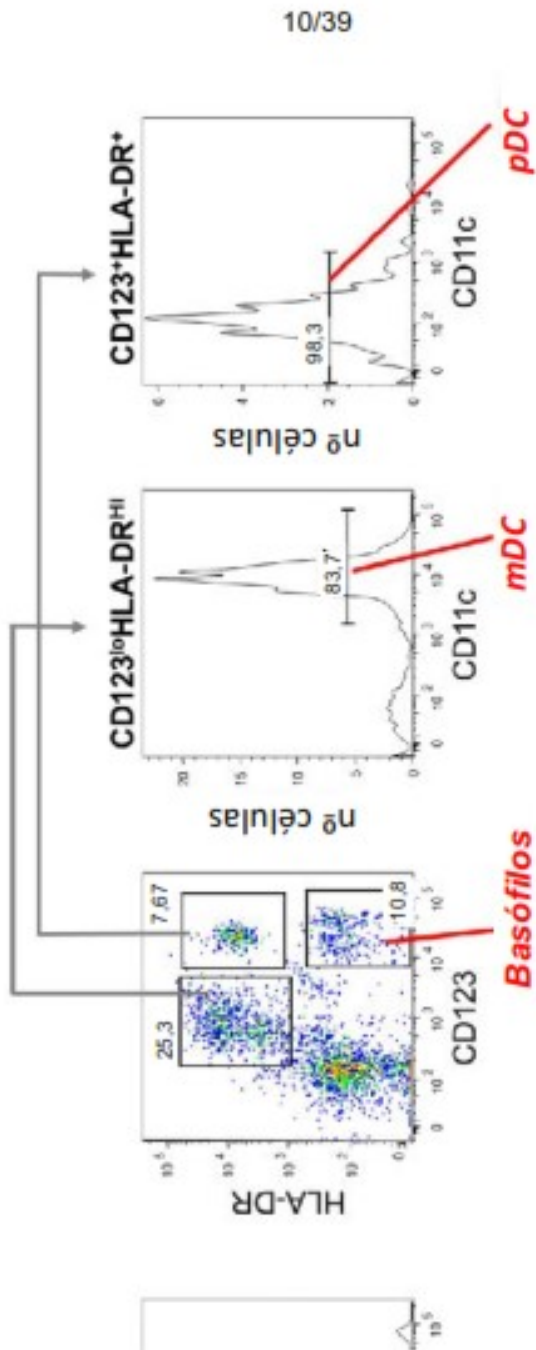
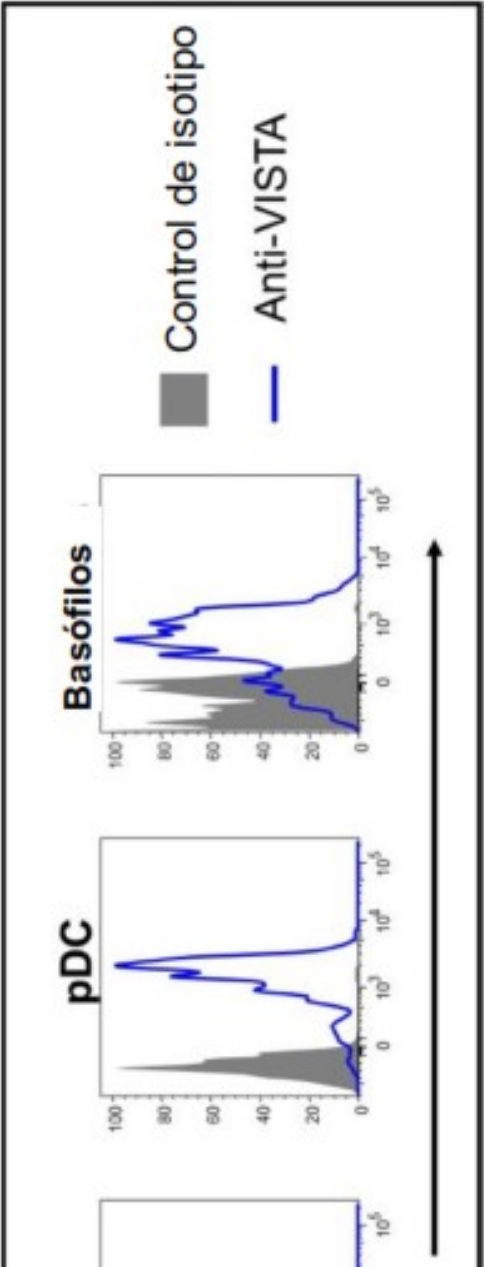


FIGURE 10A

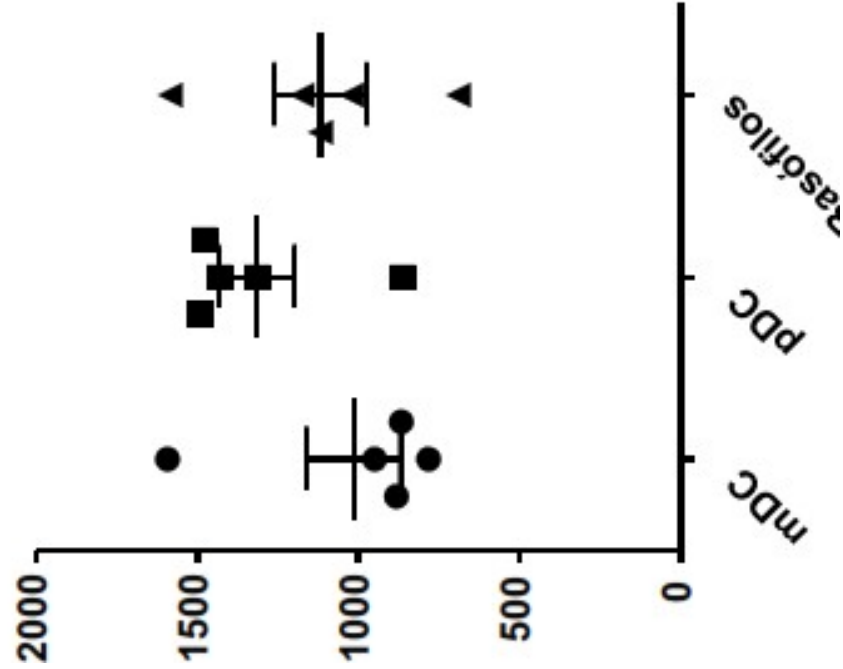
FIGURE 10B

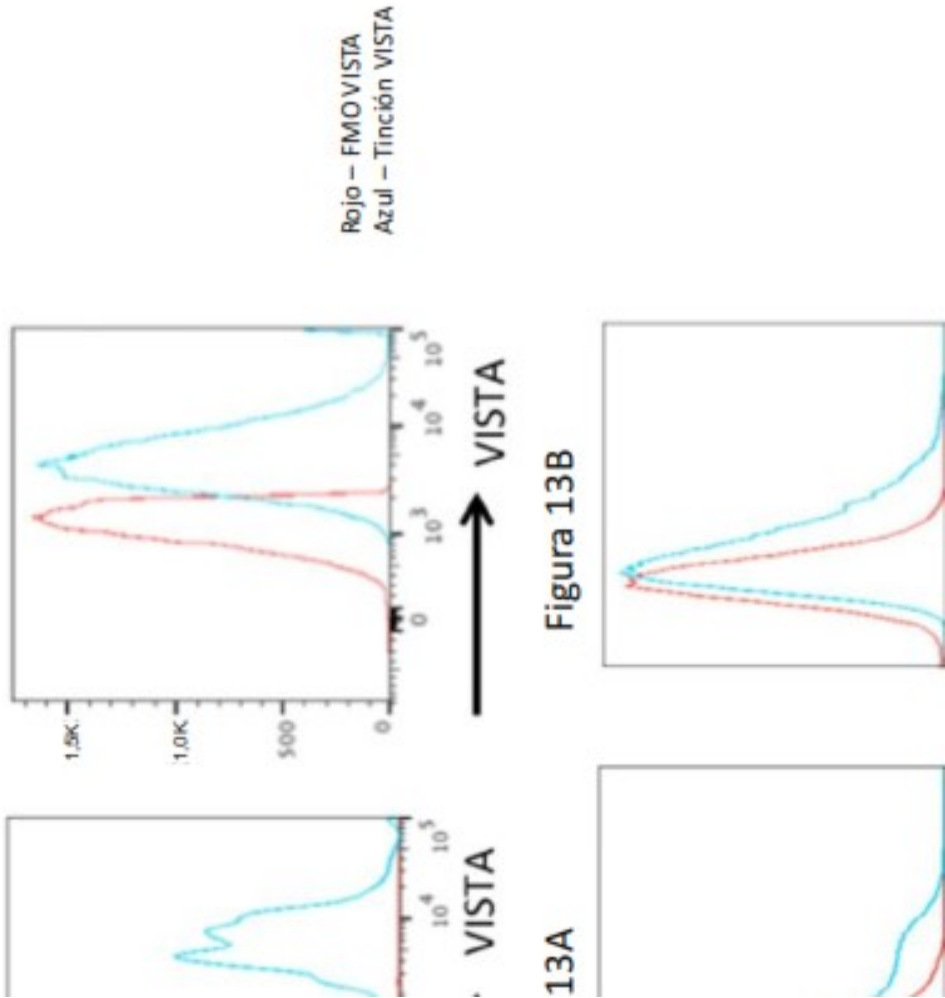
FIGURE 10C

11/39

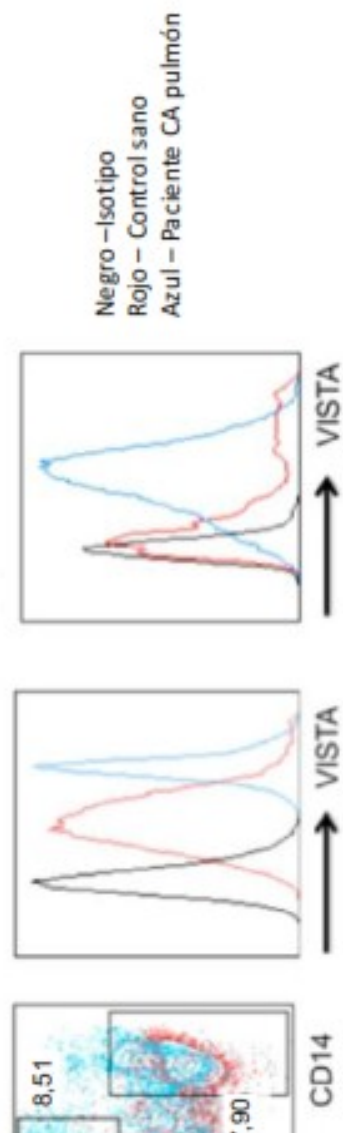


12/39





14/39



15/39

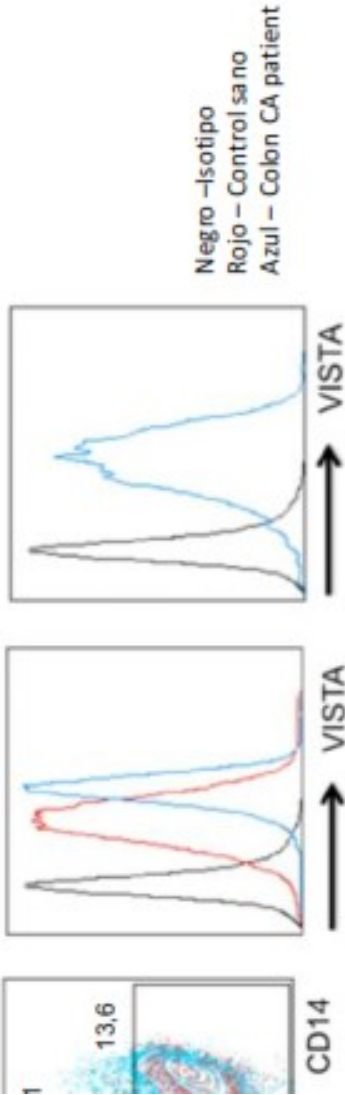
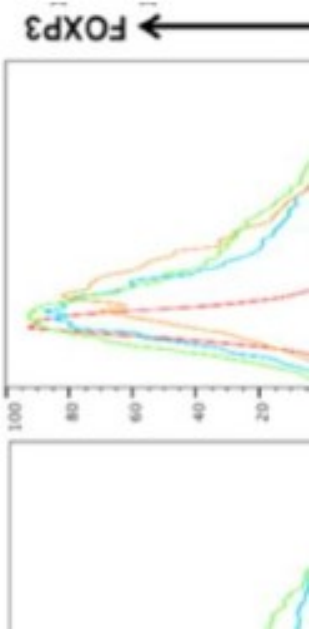
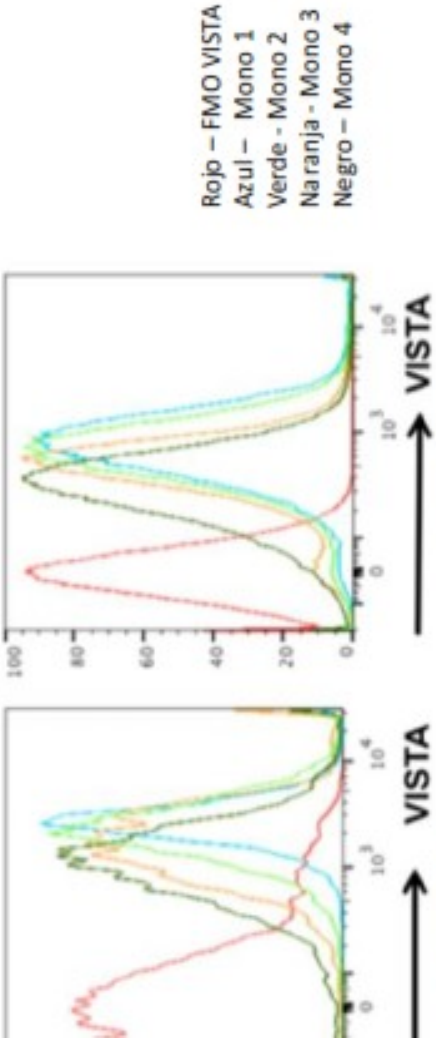


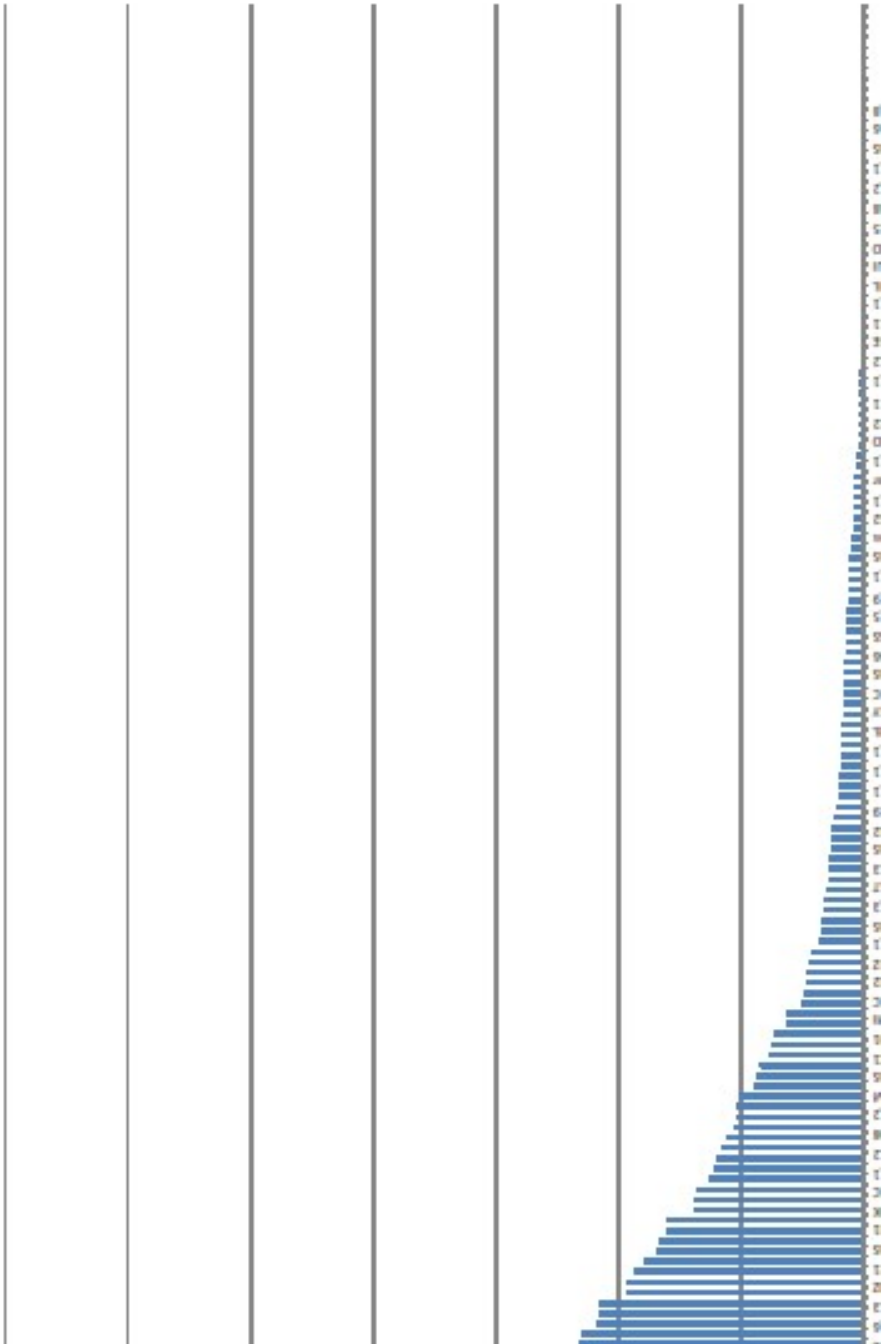
Figura 15C

Figura 15R

5A



17/39



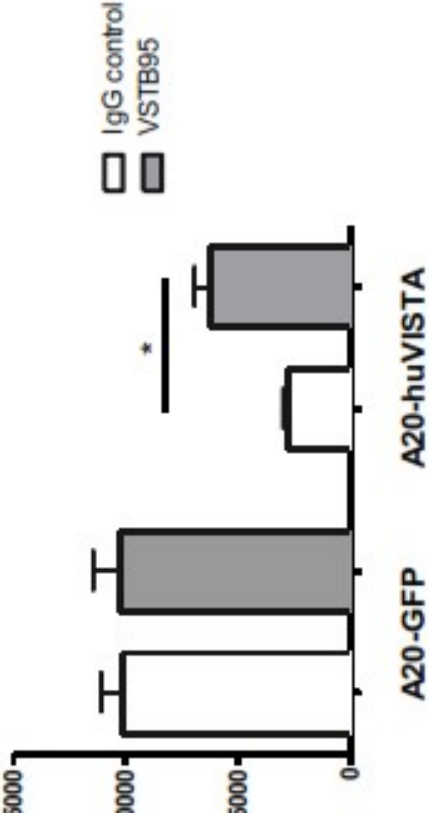


Figura 18

Figura 19D

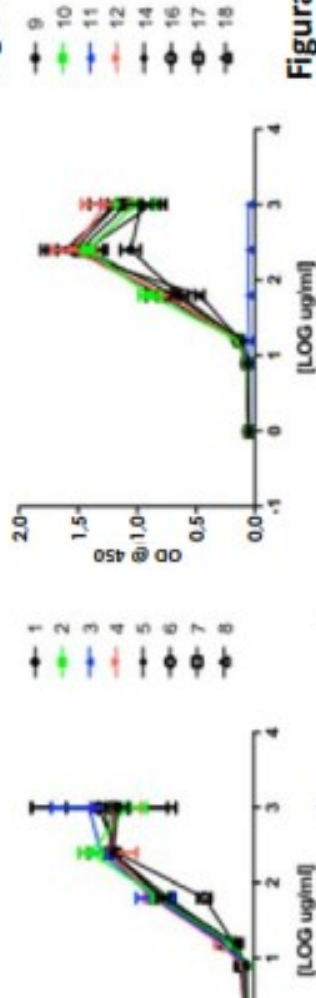


Figura 19E

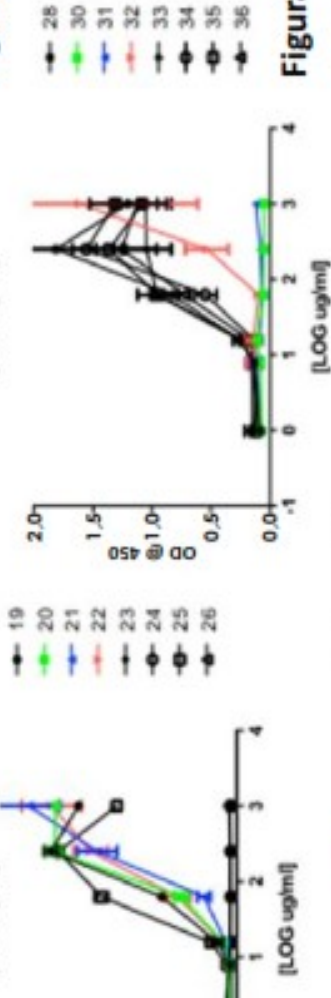
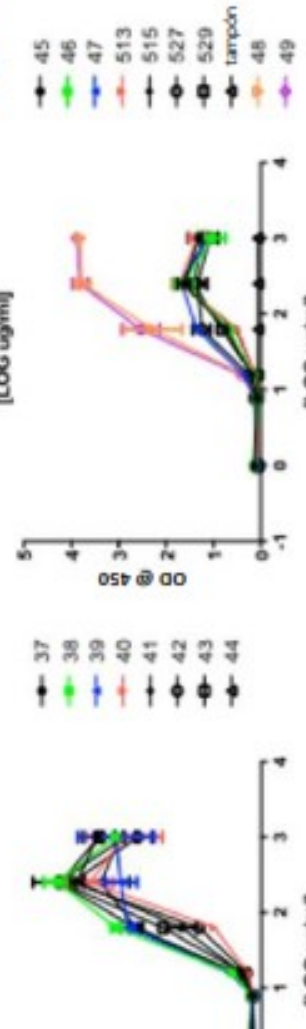
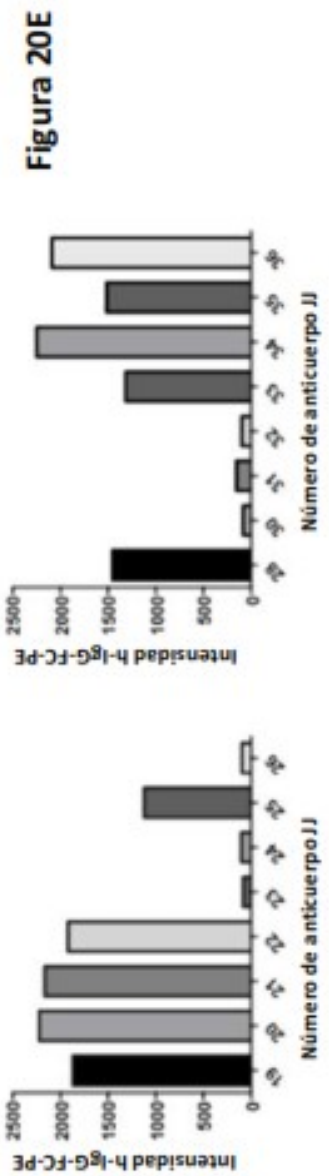
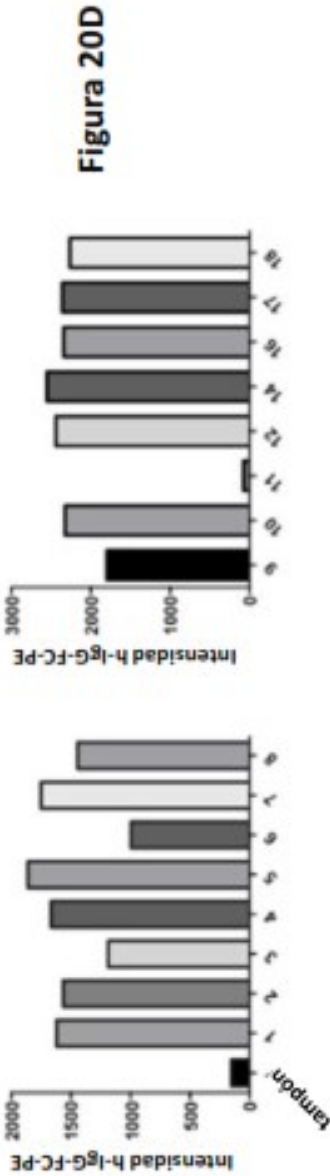
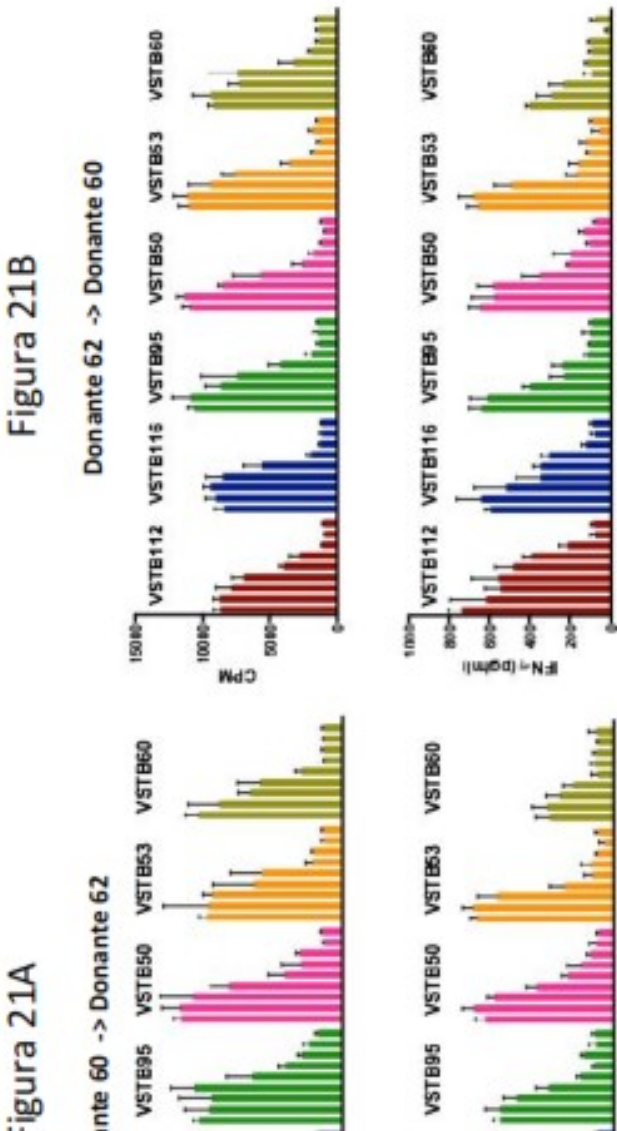


Figura 19F

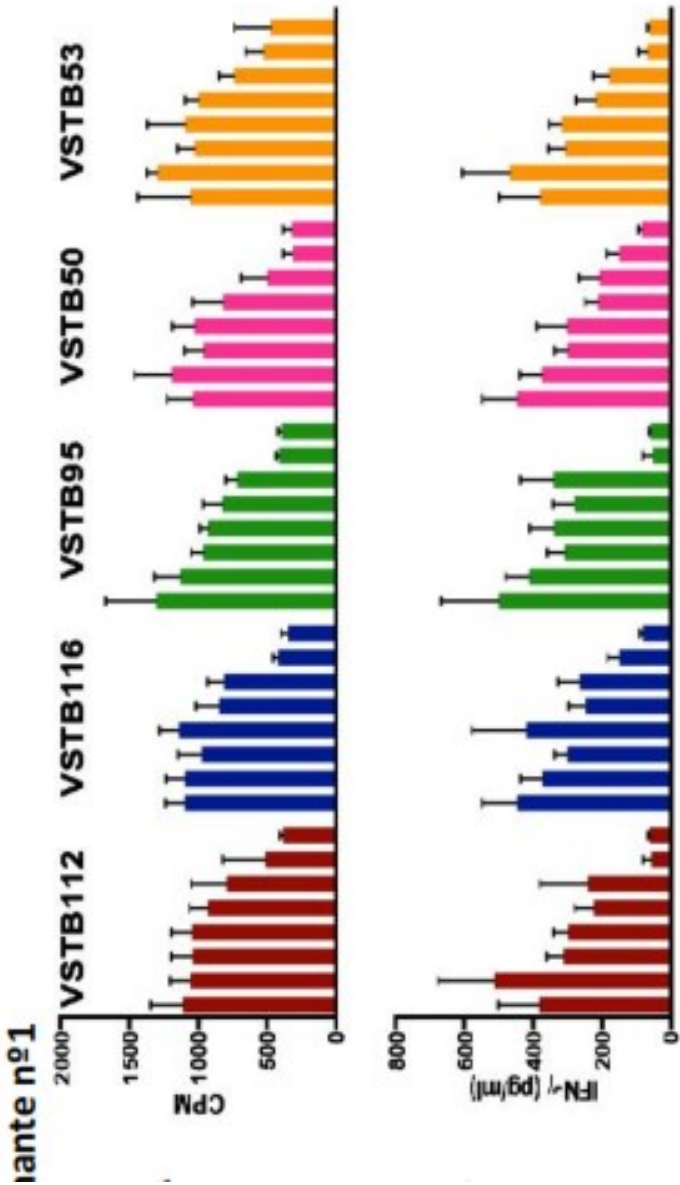


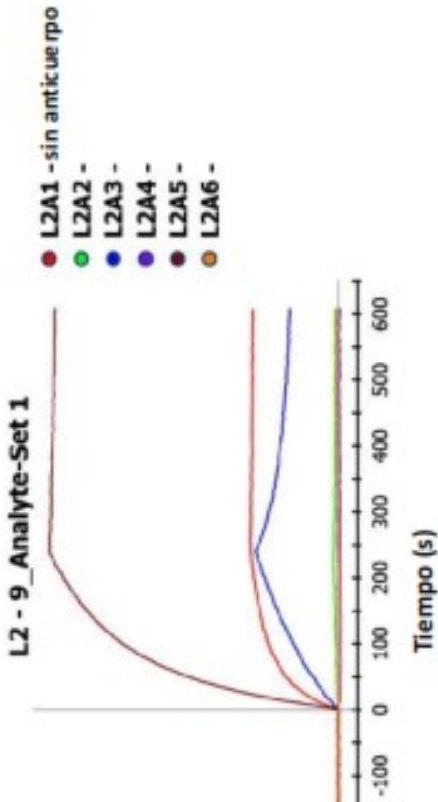




21/39

30-10-3-1-0,3-0,1-0,03-0,01-0





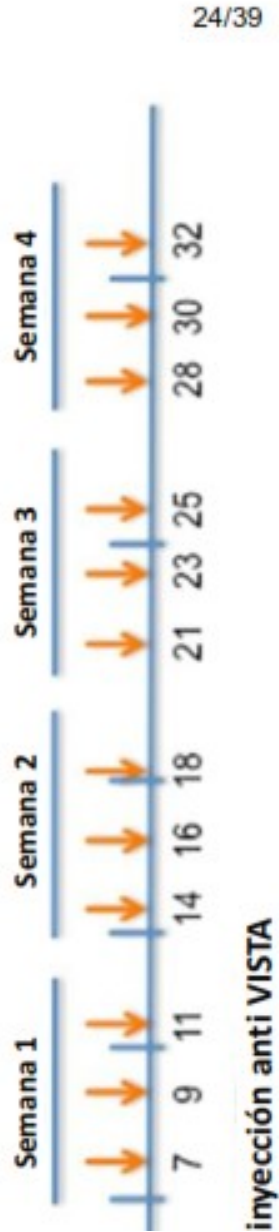


Figura 24

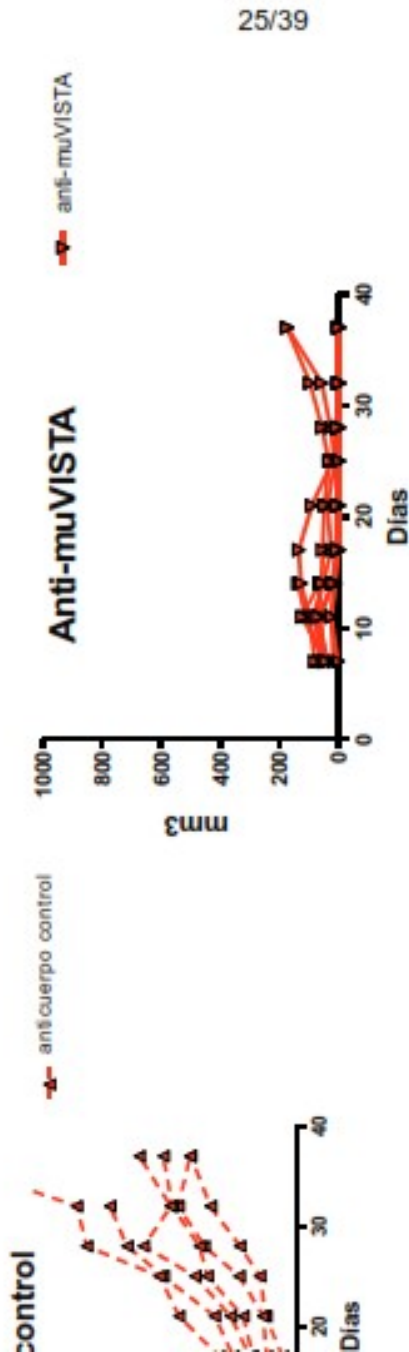
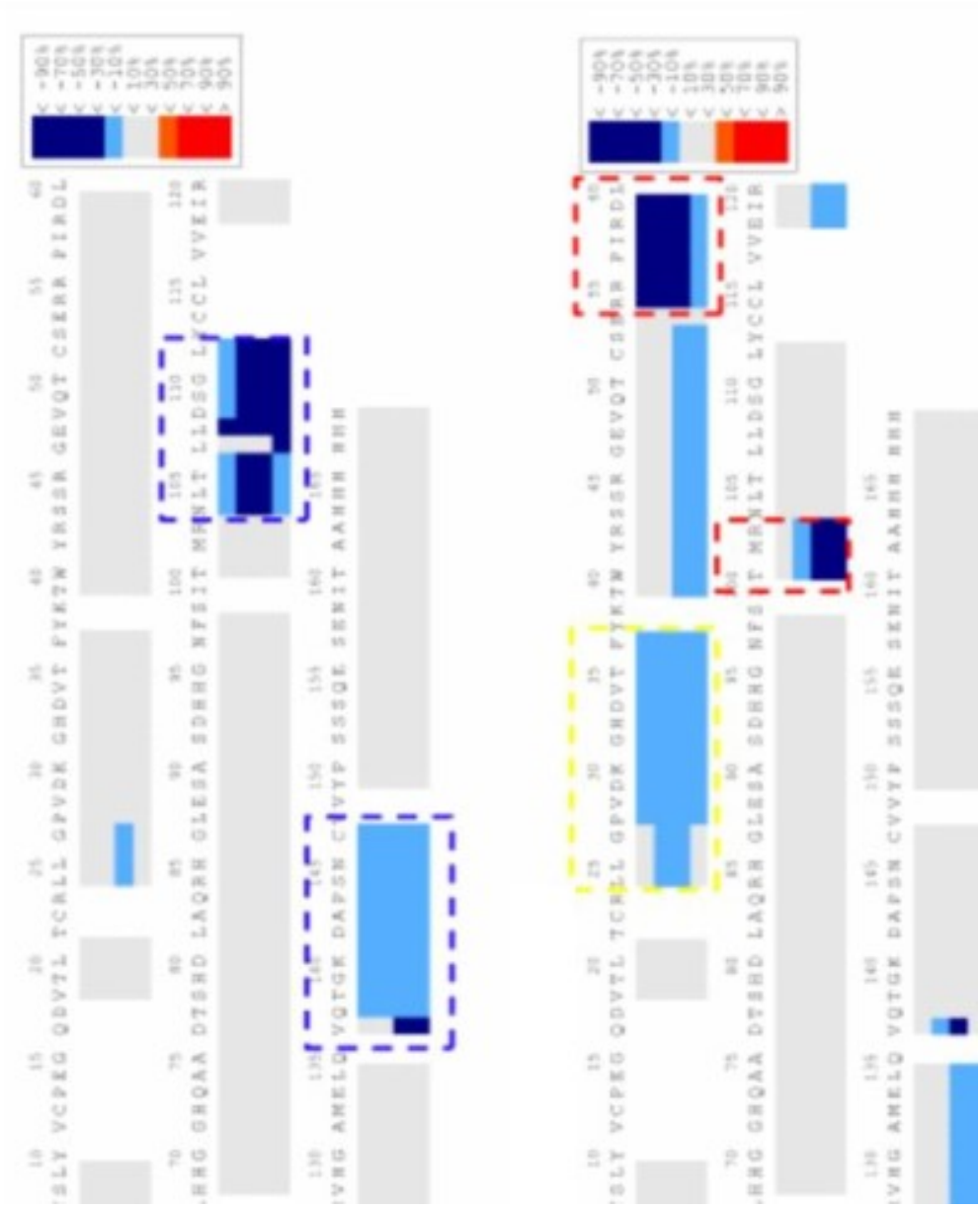
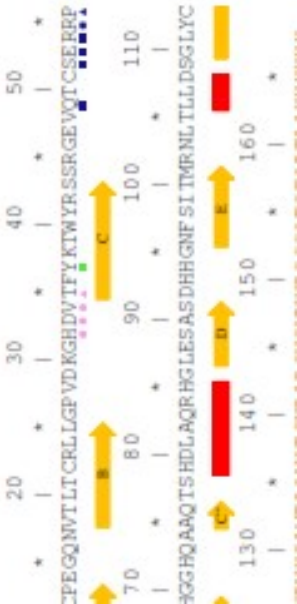
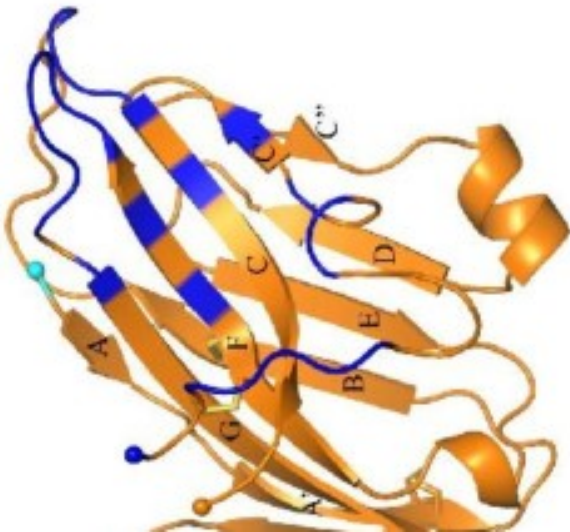


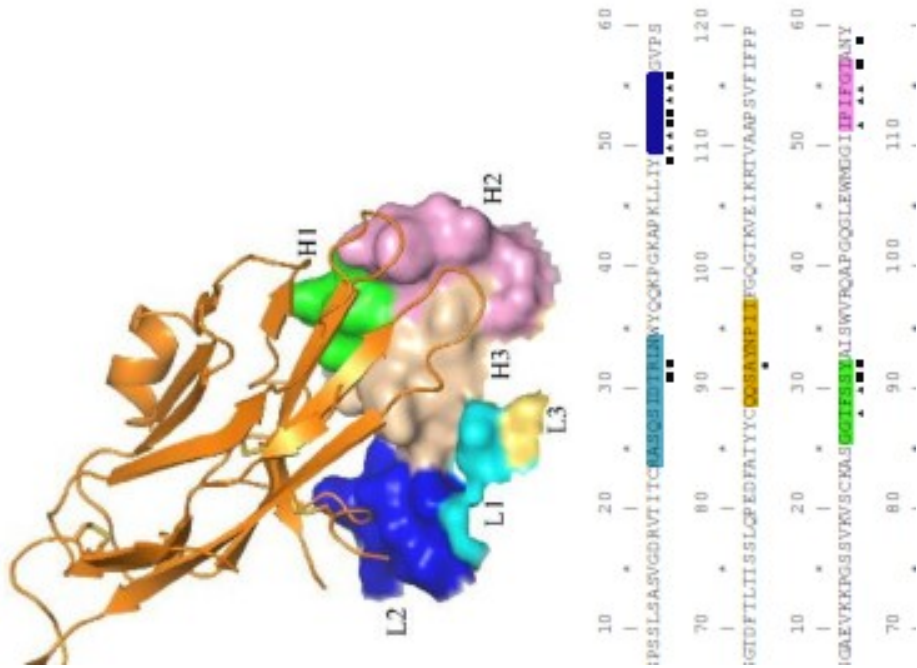
Figura 25B

Figura 25A

.EAGSWRWGSLLFALFLAASLGPVAAFKVATPYSLYVCP
TCRLLGPVDKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPI
LHLHGGHQAAANTSHDLAQRHGLESDHHGNFSIT
DSGLYCCLWVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPS
SSQSEENITAAALATGACIVGILCLPLILLVYKQ
!RAQEIVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHP
QPSSEGRHLLSEPSTPLSPPPGPDVF (SEC ID n°:46)







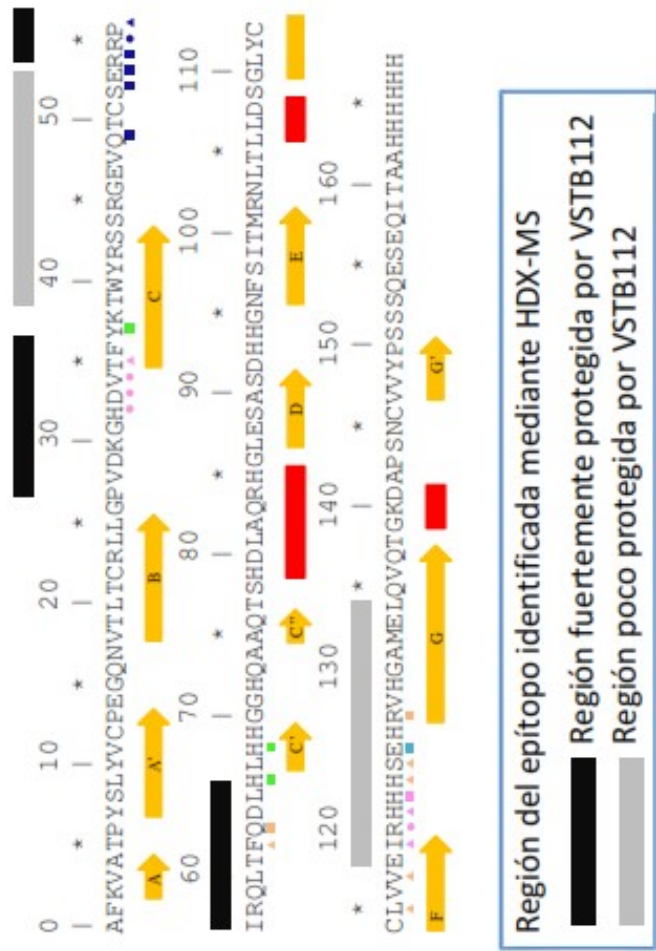
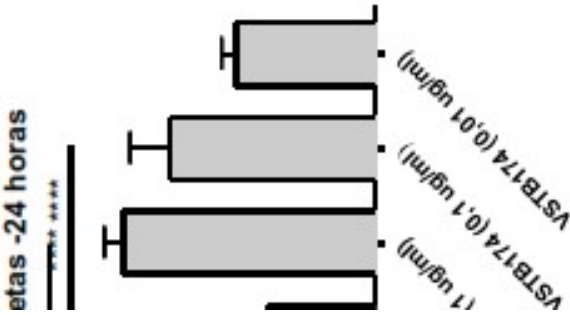
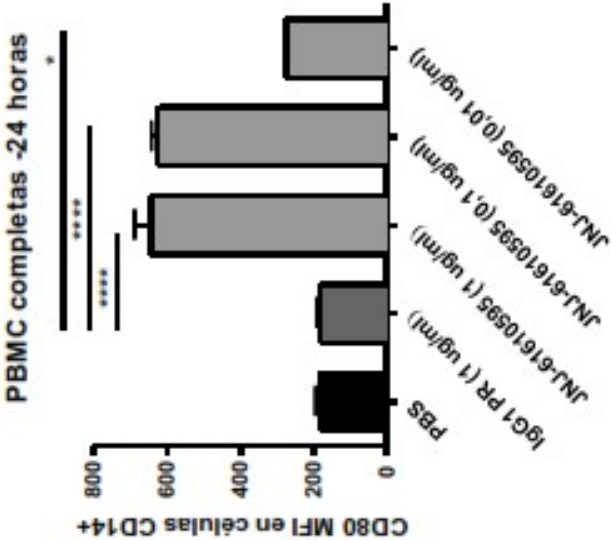
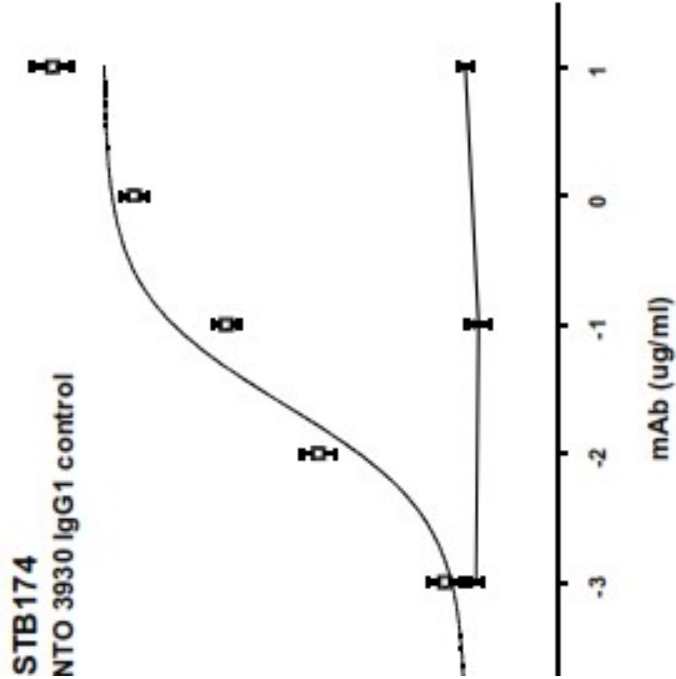


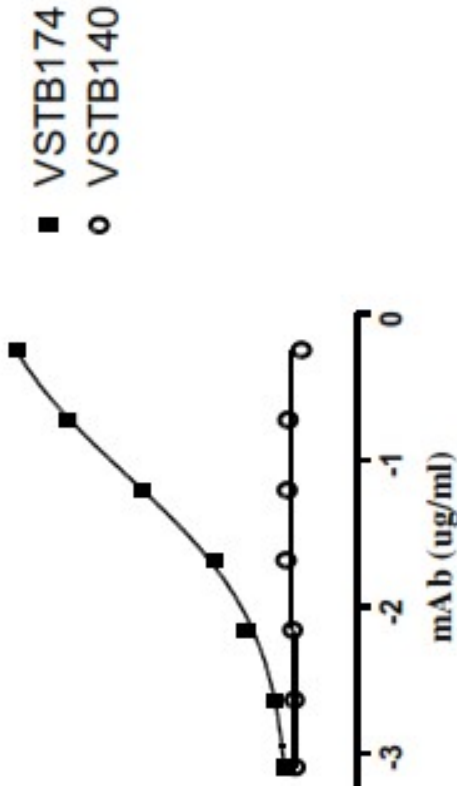
Figura 31

32/39

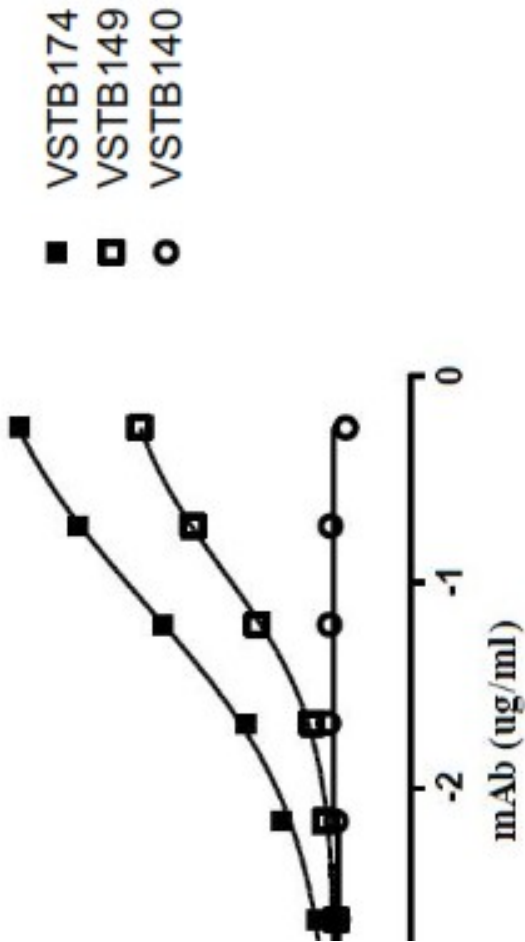




34/39



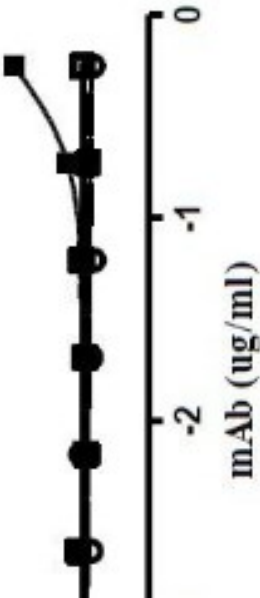
35/39



36/39

VSTB174
 VSTB149
 VSTB140

■ ■ ○



37/39

